

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

PCT

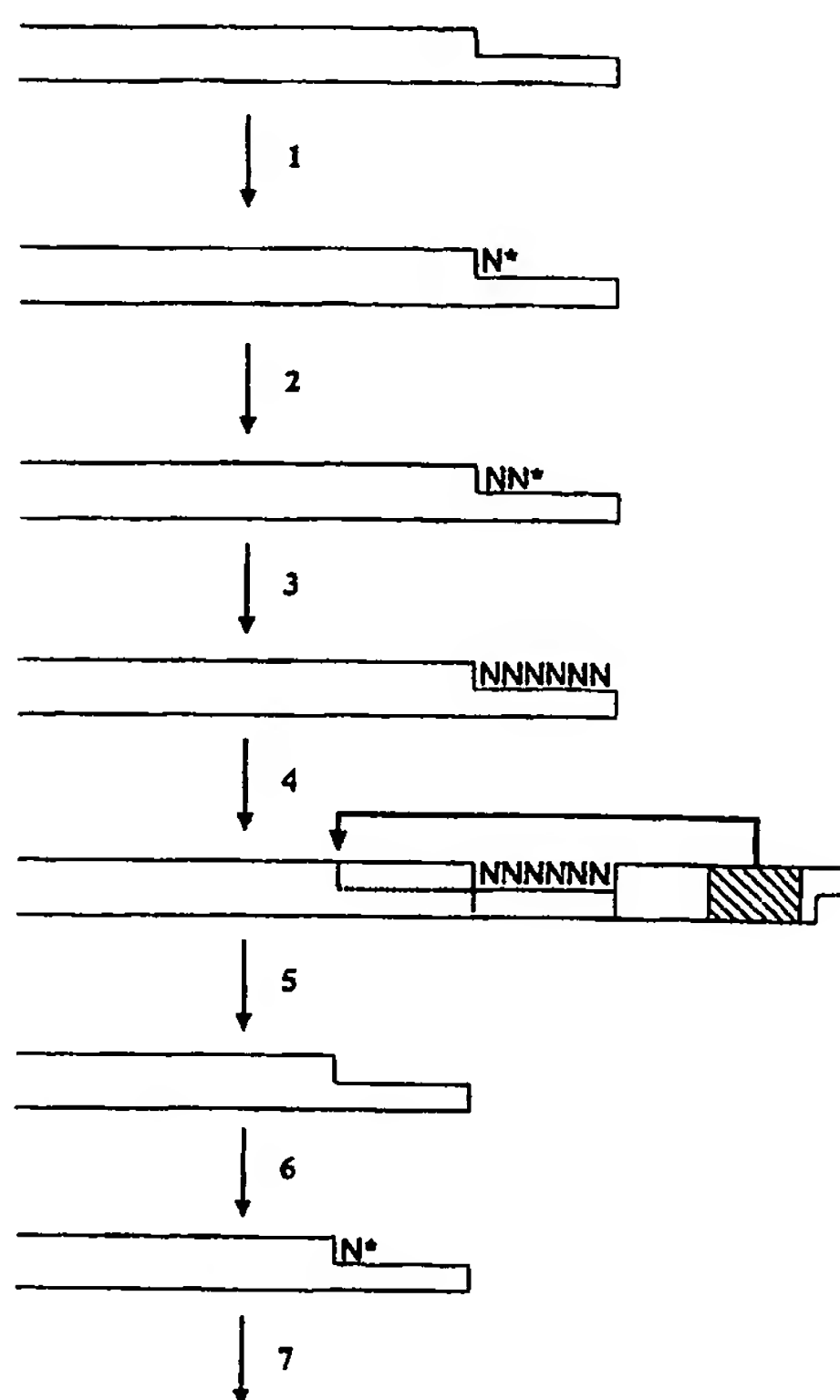
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/75154 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF-LYNX BIOSCIENCE AG [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 515, 69120 Heidelberg (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03777 (72) Erfinder; und
- (22) Internationales Anmeldedatum: 3. April 2001 (03.04.2001) (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Achim [DE/DE]; Rahmengasse 16, 69120 Heidelberg (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 16 348.3 3. April 2000 (03.04.2000) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, 100 51 564.9 18. Oktober 2000 (18.10.2000) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL METHOD FOR THE PARALLEL SEQUENCING OF A NUCLEIC ACID MIXTURE ON A SURFACE

(54) Bezeichnung: NEUE VERFAHREN ZUR PARALLELEN SEQUENZIERUNG EINES NUKLEINSÄUREGEMISCHES AN EINER OBERFLÄCHE



(57) Abstract: The invention relates to a method for the parallel sequencing of at least two nucleic acids that are contained in a nucleic acid mixture. According to said method, a surface is provided which has islands of nucleic acids, each of the same type, i.e. tertiary nucleic acids; - the tertiary nucleic acids are treated in such a way that the products are only connected to the surface by the 5' end of one strand of a double-strand; - the tertiary nucleic acids are cleaved by restriction endonucleases of the IIS type, in such a way that 3' overhanging ends or 5' overhanging ends are created; - one or more bases of the tertiary nucleic acids are determined; - linker molecules are connected by ligation to the free ends of the tertiary nucleic acid molecules, whereby the linker molecules have one or more recognition sites for restriction endonucleases of the IIS type; - the tertiary nucleic acids are cleaved once again by one or more restriction endonucleases of the IIS type, which recognize the sequence parts that have been introduced into the tertiary nucleic acids by the linker molecules in step (e); and - steps (d), (e) and (f) are repeated until the desired sequence information is obtained.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren, wobei eine Oberfläche bereitgestellt wird, aufweisend Inseln von Nukleinsäuren jeweils gleicher Sorte, tertiäre Nukleinsäuren; die tertiären Nukleinsäuren so behandelt werden, dass die Produkte nur mit dem 5'-Ende eines Stranges eines Doppelstranges mit der Oberfläche verbunden sind; die tertiären Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten werden, so dass 3'-überhängende Enden oder 5'-überhängende Enden erzeugt werden; eine oder mehrere Basen der tertiären Nukleinsäuren bestimmt werden; Linkermoleküle durch Ligation

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/75154 A2



KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

mit den freien Enden der tertiären Nukleinsäuremoleküle verbunden werden, wobei die Linkermoleküle eine oder mehrere Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS aufweisen; die tertiären Nukleinsäuren erneut durch eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten werden, die Sequenzabschnitte erkennen, die in Schritt (e) durch die Linkermoleküle in die tertiären Nukleinsäuren eingeführt worden sind; und Schritte (d), (e) und (f) sooft wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

**Neue Verfahren zur parallelen Sequenzierung eines Nukleinsäuregemisches
an einer Oberfläche**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Festphasen-gestützten parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren.

10

Ein wichtiges Verfahren der biologischen Analytik ist die Sequenzanalyse von Nukleinsäuren. Hier wird die genaue Basenfolge der interessierenden DNA- oder RNA-Moleküle bestimmt. Die Kenntnis dieser Basenfolge erlaubt beispielsweise die Identifikation bestimmter Gene oder Transkripte, also der zu diesen Genen gehörigen Boten-RNA-Moleküle, die
15 Aufdeckung von Mutationen bzw. Polymorphismen, oder auch die Identifikation von Organismen oder Viren, die sich anhand bestimmter Nukleinsäuremoleküle eindeutig erkennen lassen. Üblicherweise wird die Sequenzierung von Nukleinsäuren nach dem Kettenabbruchverfahren durchgeführt (Sanger et al. (1977) PNAS 74, 5463-5467). Hierzu wird eine enzymatische Ergänzung eines Einzelstrangs zum Doppelstrang vorgenommen, indem ein
20 an besagten Einzelstrang hybridisierter "Primer", in der Regel ein synthetisches Oligonukleotid, mittels Zugabe von DNA-Polymerase und Nukleotidbausteinen verlängert wird. Ein geringer Zusatz von Abbruch-Nukleotidbausteinen, welche nach ihrer Inkorporation in den wachsenden Strang keine weitere Verlängerung mehr zulassen, führt zur Akkumulation von Teilsträngen mit bekanntem, durch das jeweilige Abbruchnukleotid festgelegtem
25 Ende. Das so erhaltene Gemisch unterschiedlich langer Stränge wird mittels Gel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Aus den entstehenden Bandenmustern läßt sich die Nukleotidfolge des unbekannten Strangs ableiten. Ein großer Nachteil des genannten Verfahrens besteht im erforderlichen instrumentellen Aufwand, der den erreichbaren Durchsatz an Reaktionen begrenzt. Für jede Sequenzierungsreaktion ist, den Einsatz von
30 mit vier unterschiedlichen Fluorophoren markierten Abbruchnukleotiden vorausgesetzt, mindestens eine Spur auf einem Flachgel oder, beim Einsatz von Kapillarelektrophorese, mindestens eine Kapillare erforderlich. Der hierdurch entstehende Aufwand begrenzt auf den derzeit modernsten kommerziell erhältlichen Sequenzierautomaten die Zahl an parallel prozessierbaren Sequenzierungen auf maximal 96. Ein weiterer Nachteil besteht in der
35 Begrenzung der Leselänge", also der Zahl der richtig identifizierbaren Basen pro Sequenzierung, durch die Auflösung des Gelsystems. Ein alternatives Verfahren zur Sequenzierung, die Sequenzbestimmung über Massenspektrometrie, ist schneller und erlaubt daher die Prozessierung von mehr Proben in der gleichen Zeit, ist andererseits aber auf verhältnismäßig kleine DNA-Moleküle (beispielsweise 40-50 Basen) beschränkt. Bei noch einer

anderen Sequenzierungstechnik. Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH, Sequencing By Hybridization; vgl. Drmanac et al., Science 260 (1993), 1649-1652), werden Basenfolgen durch die spezifische Hybridisierung unbekannter Proben mit bekannten Oligonukleotiden identifiziert. Besagte bekannte Oligonukleotide werden hierzu in einer komplexen Anordnung auf einem Träger fixiert, eine Hybridisierung mit der markierten, zu sequenzierenden Nukleinsäure wird vorgenommen, und die hybridisierenden Oligonukleotide werden ermittelt. Aus der Information darüber, welche Oligonukleotide mit der unbekannten Nukleinsäure hybridisiert haben, und aus ihrer Sequenz läßt sich dann die Sequenz der unbekannten Nukleinsäure ermitteln. Ein Nachteil des SBH-Verfahrens ist die Tatsache, daß sich die optimalen Hybridisierungsbedingungen für Oligonukleotide nicht exakt vorhersagen lassen und sich dementsprechend kein großer Satz an Oligonukleotiden entwerfen läßt, die einerseits alle bei ihrer gegebenen Länge möglichen Sequenzvariationen enthalten und andererseits exakt die gleichen Hybridisierungsbedingungen benötigen. Somit kommt es durch unspezifische Hybridisierung zu Fehlern in der Sequenz-Bestimmung. Außerdem kann das SBH-Verfahren nicht für repetitive Regionen zu sequenzierender Nukleinsäuren eingesetzt werden.

Neben der Analyse der Expressionsstärke bekannter Gene, wie sie durch Dot Blot-Hybridisierung, Northern-Hybridisierung und quantitative PCR möglich ist, sind auch Verfahren bekannt, welche die *de novo*-Identifikation unbekannter zwischen verschiedenen biologischen Proben differentiell exprimierter Gene ermöglichen.

Eine solche Strategie zur Expressionsanalyse besteht in der Quantifizierung diskreter Sequenzeinheiten. Diese Sequenzeinheiten können in sog. ESTs (Expressed Sequence Tags) bestehen. Werden hinreichende Zahlen von Klonen aus cDNA-Banken, die von miteinander zu vergleichenden Proben stammen, sequenziert, können jeweils identische Sequenzen erkannt und gezählt werden und die erhaltenen relativen Häufigkeiten dieser Sequenzen in den verschiedenen Proben miteinander verglichen werden (vgl. Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995), 8303-8307). Unterschiedliche relative Häufigkeiten einer bestimmten Sequenz zeigen differentielle Expression des entsprechenden Transkripts an. Allerdings ist das beschriebene Verfahren sehr aufwendig, da bereits für die Quantifizierung der häufigeren Transkripte die Sequenzierung vieler tausend Klone erforderlich ist. Andererseits ist für die eindeutige Identifikation eines Transkripts in der Regel lediglich ein kurzer Sequenzabschnitt von ca. 13-20 Basenpaaren Länge erforderlich. Diese Tatsache wird vom Verfahren des "Serial Analysis of Gene Expression" (SAGE) ausgenutzt (Velculescu et al, Science 270 (1995), 484-487). Hier werden kurze Sequenzabschnitte ("Tags") konkateniert, kloniert, und die resultierenden Klone werden sequenziert. Mit einer einzelnen Sequenzreaktion lassen sich auf diese Weise etwa 20 Tags bestimmen. Dennoch ist diese Technik noch nicht sehr leistungsfähig, da bereits für die Quantifizierung der

häufigeren Transkripte sehr viele konventionelle Sequenzreaktionen durchgeführt und analysiert werden müssen. Aufgrund des hohen Aufwands ist eine verlässliche Quantifizierung seltener Transkripte mittels SAGE nur sehr schwer möglich.

- 5 Ein weiteres Verfahren zur Sequenzierung von Tags nach der US-A 5 695 934 besteht darin, kleine Kugeln mit zu sequenzierender Nukleinsäure auf eine solche Weise zu beschichten, daß jede Kugel zahlreiche Moleküle lediglich einer Nukleinsäurespezies erhält. Zur Sequenzierung wird dann das Verfahren des "stepwise ligation and cleavage" eingesetzt, bei dem von einem artifiziellen Linker aus die zu sequenzierende Nukleinsäure durch
- 10 Einsatz eines Typ IIS-Restriktionsenzym basenweise abgebaut und dabei ihre Sequenz bestimmt wird. Damit eine Beobachtung und Aufzeichnung des Sequenzvorgangs möglich ist, werden die verwendeten Kugeln in eine flachen Küvette eingebracht, die nur wenig höher ist als dem Kugeldurchmesser entspricht, um die Bildung einer einzelnen Lage zu erlauben. Weiterhin müssen die Kugeln in dichtester Packung in der Küvette vorliegen,
- 15 damit es während des Sequenzvorgangs weder durch den erforderlichen Austausch der Reaktionslösungen noch durch Erschütterungen des Geräts zu einer Veränderung der Kugelanordnung kommt. Obschon sich auf diese Weise viele Sequenzierreaktionen auf kleinem Raum durchführen lassen, hat die Anordnung in einer sehr engen Küvette (wenige Mikrometer Höhe) erhebliche Nachteile, da eine gleichmäßige Befüllung der Küvette
- 20 schwer zu erreichen ist. Ein weiterer Nachteil besteht im hohen apparativen Aufwand des Verfahrens. So muß beispielsweise mit hohen Drucken gearbeitet werden, damit trotz der kleinen Küvettengröße ein effizienter Austausch der notwendigen Reaktionslösungen möglich ist. Noch ein weiterer Nachteil besteht im leichten Verstopfen der Küvette, welches ebenfalls durch die notwendigerweise geringen Maße der Küvette begünstigt wird.

25

Die bekannten Verfahren zur Nukleinsäureseanalytik weisen einen oder mehrere der folgenden Nachteile auf:

- Sie ermöglichen nur in stark eingeschränkten Umfang die parallelisierte Durchführung von einzelnen Sequenzierungsreaktionen.
 - 30 - Sie benötigen relativ große Mengen der Nukleinsäure, deren Sequenz bestimmt werden soll.
 - Sie sind nur zur Sequenzbestimmung von kurzen Sequenzabschnitten geeignet und apparativ aufwendig.
- 35 Es ist Aufgabe der Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, das die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren gelöst, wobei

- 5 (a) eine Oberfläche bereitgestellt wird, aufweisend Inseln von Nukleinsäuren jeweils gleicher Sorte, tertiäre Nukleinsäuren;
- (b) die tertiären Nukleinsäuren so behandelt werden, daß die Produkte nur mit dem 5'-Ende eines Stranges eines Doppelstranges mit der Oberfläche verbunden sind;
- (c) die tertiären Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten werden;
- 10 (d) eine oder mehrere Basen der tertiären Nukleinsäuren bestimmt werden;
- (e) Linkermoleküle durch Ligation mit den freien Enden der tertiären Nukleinsäuremoleküle verbunden werden, wobei die Linkermoleküle eine oder mehrere Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS aufweisen;
- 15 (f) die tertiären Nukleinsäuren erneut durch eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten werden, die Sequenzabschnitte erkennen, die in Schritt (e) durch die Linkermoleküle in die tertiären Nukleinsäuren eingeführt worden sind; und
- (g) Schritte (d), (e) und (f) solange wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

20

Die Schritte (b) und (c) oder (d) und (e) können durch eine einzige Verfahrensmaßnahme realisiert werden. Die Reihenfolge der Schritte (d), (e) und (f) ist abhängig von der Spaltcharakteristik der eingesetzten Restriktionsendonukleasen und insoweit veränderbar (vgl. den nachfolgenden Text).

- 25 Eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stellt das nachfolgende dar, bei dem im Schritt (a)

- 30 (a1) eine Oberfläche bereitgestellt wird, an welche mindestens Primermoleküle eines ersten Primers und eines zweiten Primers und gegebenenfalls ein Nukleinsäuregemisch umfassend die Nukleinsäuremoleküle, mit welchen beide Primer hybridisieren können, irreversibel immobilisiert worden sind, wobei beide Primer ein Primerpaar bilden;
- (a2) Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs mit einem oder mit beiden Primern desselben Primerpaares hybridisiert werden;
- 35 (a3) die irreversibel immobilisierten Primermoleküle komplementär zum Gegenstrang unter Bildung von sekundären Nukleinsäuren verlängert werden;

- (a4) die Oberfläche in einer von Nukleinsäuremolekülen, die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen sind, befreiten Form bereitgestellt wird;
- (a5) die sekundären Nukleinsäuren unter Bildung von tertiären Nukleinsäuren amplifiziert werden.

5

Tertiäre Nukleinsäuren nach Maßgabe des Schritts (a) können bereitgestellt werden, indem man von einer Oberfläche ausgeht, an welche mindestens ein erster Primer und ein zweiter Primer und gegebenenfalls ein Nukleinsäuregemisch umfassend die Nukleinsäuremoleküle, mit welchen beide Primer hybridisieren können, irreversibel immobilisiert worden sind. Beide Primer bilden ein Primerpaar, können also an Strang bzw. Gegenstrang der Nukleinsäuremoleküle binden. Wenn die Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs an der Oberfläche bereits gebunden sind, dann kann die Hybridisierung in Schritt (a2) durch bloßes Erhitzen und Abkühlen bewirkt werden. Andernfalls müssen die Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs in Schritt (a2) mit der Oberfläche in Kontakt gebracht werden. In diesem Zusammenhang wird auch auf die WO 00/18957 verwiesen.

10

Eine spezielle Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stellt das nachfolgende dar, bei dem im Schritt (a1)

15

eine Oberfläche, an welche mindestens ein Primerpaar bildende Primermoleküle irreversibel immobilisiert wurden, bereitgestellt wird.

Die einzelnen durchzuführenden Arbeitsschritte lassen sich zum Beispiel bei dieser Ausführungsform auch wie folgt ausgestalten:

20

- Primermoleküle, die mindestens ein Primerpaar bilden, werden an eine Oberfläche irreversibel immobilisiert;
- Nukleinsäuremoleküle werden mit einem oder mit beiden Primern desselben Primerpaars hybridisiert, indem man das Nukleinsäuregemisch mit der Oberfläche in Kontakt bringt;
- Die irreversibel immobilisierten Primermoleküle werden komplementär zum Gegenstrang unter Bildung von sekundären Nukleinsäuren verlängert;
- die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen Nukleinsäuremoleküle werden von der Oberfläche entfernt;
- die sekundären Nukleinsäuren werden unter Bildung von tertiären Nukleinsäuren amplifiziert;
- die tertiären Nukleinsäuren werden so behandelt, daß die Produkte nur mit dem 5'-Ende eines Stranges eines Doppelstranges mit der Oberfläche verbunden sind;
- die tertiären Nukleinsäuren werden durch Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten, so daß 3'-überhängende Enden oder 5'-überhängende Enden erzeugt werden;

25

30

35

- eine oder mehrere Basen der überhängenden Enden werden bestimmt;
- Linkermoleküle durch Ligation mit den freien Enden der tertiären Nukleinsäuremoleküle verbunden werden, wobei die Linkermoleküle eine oder mehrere Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS aufweisen;
- 5 • Die tertiären Nukleinsäuren werden erneut durch eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten, die Sequenzabschnitte erkennen, die durch die Linkermoleküle in die tertiären Nukleinsäuren eingeführt worden sind; und
- der vorvorletzte Schritt und die nachfolgende Schritte solange wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

10

Bei dem Nukleinsäuregemisch des Schritts (a2) kann es sich zum Beispiel um eine Bibliothek handeln, also um Nukleinsäuremoleküle, die über weite Strecken eine identische Sequenz aufweisen, sich aber in einem Teilbereich inmitten der identischen Bereiche stark unterscheiden. Häufig bestehen die Bibliotheken aus gegebenenfalls linearisierten Plasmi-

15 den, in welche verschiedene Nukleinsäurefragmente einkloniert wurden, die später sequenziert werden sollen. Ferner kann es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um Restriktionsfragmente handeln, an deren Schnittenden Linkermoleküle gleicher Sequenz ligiert wurden. Hierbei unterscheiden sich in der Regel die Linker, die an das 5'-Ende der Fragmente gebunden werden von den Linkern, die an das 3'-Ende der Fragmente gebunden werden.

20 Jedenfalls ist in der Regel der interessierende Sequenzabschnitt in den Nukleinsäuremolekülen des Nukleinsäuregemischs von zwei flankierenden im wesentlichen bei allen Nukleinsäuremolekülen jeweils identischen Sequenzabschnitten umgeben, von denen mindestens einer der beiden Sequenzabschnitte bevorzugt eine selbstkomplementäre Sequenz aufweist. Der betreffende Sequenzabschnitt besitzt in einzelsträngiger Form eine ausge-

25 prägte Neigung zur Ausbildung einer sogenannten Hairpinstruktur.

Die Primer oder die Primermoleküle in Schritt (a1 bis a3) sind einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle einer Länge von etwa 12 bis etwa 60 Nukleotidbausteinen und mehr, die sich im weitesten Sinne für die Verwendung im Rahmen der PCR eignen.. Es handelt sich um

30 DNA-Moleküle, RNA-Moleküle oder deren Analoga, die zur Hybridisierung mit einer zumindest über einen Teilbereich komplementären Nukleinsäure bestimmt sind und als Hybrid mit der Nukleinsäure ein Substrat für eine Dopplestrang-spezifische Polymerase darstellen. Bei der Polymerase handelt es sich vorzugsweise um DNA-Polymerase I, T7-DNA-Polymerase, das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, um Polymerasen, die bei

35 der PCR Anwendung finden, oder auch um eine Reverse Transkriptase.

Das Primerpaar in Schritt (a2) stellt einen Satz von zwei Primern dar, die an Bereiche einer Nukleinsäure binden, die die zu amplifizierende Zielsequenz der Nukleinsäure flankieren

und eine „Polarität“ in bezug auf die Orientierung ihrer Bindung an die Nukleinsäure aufweisen, daß eine Amplifikation möglich ist (die 3'-Termini weisen aufeinander zu). Bei diesen Bereichen handelt es sich bevorzugt um Sequenzabschnitte, die bei den Nukleinsäuremolekülen des Nukleinsäuregemisches identisch sind. Zum Beispiel kann es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um eine Plasmid-Bibliothek handeln. Die Primer würden dann bevorzugt in dem Bereich der sogenannten Multiple Cloning Site (MCS) binden, und zwar einmal oberhalb und einmal unterhalb der Klonierungsstelle. Ferner könnten die Primer an die Sequenzabschnitte binden, die den Linkern entsprechen, die, wie oben beschrieben, an Restriktionsfragmente beidseitig ligiert wurden. Das erfindungsgemäße Verfahren wird bevorzugt mit nur einem Primerpaar durchgeführt, etwa wie das in der US-A 5 641 658 (WO 96/04404) beschriebene Verfahren, in dem auch nur ein Primerpaar eingesetzt wird. Erfindungsgemäß bevorzugt binden die Primer des Primerpaars oder der Primerpaare an Sequenzbereiche, die bei allen oder bei fast allen Nukleinsäuren des Nukleinsäuregemisches im wesentlichen identisch sind (sogenannte konservierte Bereiche). Die Primer eines Primerpaars können im übrigen auch dieselbe Sequenz aufweisen. Dies kann dann von Vorteil sein, wenn die konservierten Bereiche, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, Sequenzen aufweisen, die zu einander komplementär sind.

Einer der Primer eines Primerpaars kann eine Sequenz, die die Ausbildung einer intramolekularen Nukleinsäuredoppelhelix (einer sogenannten Hairpinstruktur) ermöglicht, aufweisen, wobei allerdings ein aus mindestens 13 Nukleotidbausteinen bestehender Bereich des 3'-Terminus ungepaart bleibt.

Bei der Oberfläche in Schritt (a, a1 und a2, a4) handelt es sich um die zugängliche Fläche eines Körpers aus Kunststoff, Metall, Glas, Silicium oder ähnlich geeigneten Werkstoffen. Vorzugsweise ist diese flach, insbesondere plan ausgestaltet. Die Oberfläche kann eine quellbare Schicht aufweisen, zum Beispiel aus Polysacchariden, Polyzuckeralkoholen oder quellbaren Silikaten.

Irreversible Immobilisierung meint das Ausbilden von Wechselwirkungen mit der oben beschriebenen Oberfläche, die bei 95°C und der üblichen Ionenstärke bei den PCR-Amplifikationen des Schritts (a5) im Stundenmaßstab stabil sind. Bevorzugterweise handelt es sich dabei um kovalente Bindungen, die auch spaltbar sein können. Bevorzugt werden die Primermoleküle in Schritt (a) über die 5'-Termini irreversibel an der Oberfläche immobilisiert. Alternativ kann eine Immobilisierung auch über ein oder mehrere Nukleotidbausteine, die zwischen den Termini des betreffenden Primermoleküls liegen, immobilisiert werden, wobei allerdings ein Sequenzabschnitt von mindestens 13 Nukleotidbausteinen gerechnet von dem 3'-Terminus ungebunden bleiben muß. Bevorzugt erfolgt die Immobilisierung durch Ausbildung kovalenter Bindungen. Hierbei ist natürlich auf eine ent-

sprechende Belegungsdichte zu achten, die die Kontaktaufnahme der an der Polymerasekettenreaktion beteiligten Primer und Nukleinsäuren ermöglicht. Werden zwei Primer immobilisiert, so sollten die Primer einen mittleren Abstand auf der Oberfläche haben, der zumindest größenordnungsmäßig mit der maximalen Länge bei vollständiger Streckung der zu amplifizierenden Nukleinsäuremoleküle übereinstimmt oder aber kleiner ist. Hierbei ist im wesentlichen zu verfahren, wie in US-A 5 641 658 oder WO 96/04404 beschrieben.

Aus dem Stand der Technik sind Verfahren bekannt, chemisch geeignet derivatisierte Oligonukleotide an bestimmte Oberflächen zu binden. Besonders geeignet ist die Carbodii-
mid-vermittelte Bindung 5'-phosphorylierter Oligonukleotide an aktivierte Polystyrolträger (Rasmussen et al., Anal. Biochem 198 (1991), 138-142). Ein anderes bekanntes Verfahren nutzt die hohe Affinität von Gold für Thiolgruppen zur Bindung von Thiol-modifizierten Oligonukleotiden an Goldoberflächen aus (Hegner et al, FEBS Lett 336 (1993), 452-456). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung von derivatisierten Oligonukleotiden an Glasoberflächen. Hierbei werden zum Beispiel endständige, über einen mehratomigen Spacer an das 5'-Ende des Oligonukleotids gebundene primäre Aminogruppen ("Aminolink"), welche leicht im Zuge der Oligonukleotidsynthese inkorporiert werden können, an Isothiocyanat-modifizierte Glasoberflächen gebunden. Beispielsweise beschreiben Guo et al. (Nucleic Acids Res. 22 (1994), 5456-5465) ein Verfahren, Glasoberflächen mit Aminosilan und Phenylendiisothiocyanat zu aktivieren und anschließend 5'-aminomodifizierte Oligonukleotide hieran zu binden. Bevorzugt ist hierbei die Verwendung kommerziell erhältlicher Glasträger, welche einerseits zur Bindung von Aminolink-modifizierten Oligonukleotiden aktiviert sind und andererseits eine strukturierte Oberfläche aufweisen, welche gegenüber einer planen Oberfläche eine größere Bindungskapazität besitzt (Fa. Surmodics, Eden Prairie, Minnesota, USA).

Der Begriff sekundäre Nukleinsäure in Schritt (a3) bezeichnet diejenigen Nukleinsäuremoleküle, die durch komplementäre Verlängerung von Primermolekülen entstehen, wobei die Verlängerung komplementär zu den Nukleinsäuremolekülen des Schritts (a2) erfolgt, die mit den Primern hybridisiert wurden.

30

Die Oberfläche wird in einer von Nukleinsäuremolekülen, die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen sind, befreiten Form bereitgestellt [Schritt (a4)]. Sofern die Nukleinsäuremoleküle aus Schritt (a1) in Schritt (a1) an die Oberfläche bereits irreversibel immobilisiert worden sind, werden in Schritt (a2) in der Regel keine Nukleinsäuremoleküle mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Folglich müssen sie in den nachfolgenden Schritten auch nicht entfernt werden. Wenn in Schritt (a2) Nukleinsäuremoleküle zwecks Hybridisierung mit den Primern mit der Oberfläche in Kontakt gebracht werden, etwa weil die Nukleinsäuremoleküle nicht schon in Schritt (a1) an die Oberfläche

35

irreversibel immobilisiert worden sind, dann können diese in Schritt (a4) durch Denaturierung und Waschen entfernt werden. Es ist möglich, die Entfernung der vorgenannten Nukleinsäuremoleküle erst nach Durchlaufen eines oder mehrerer Amplifikationszyklen des Schritts (a5) vorzunehmen.

5

Der Begriff tertiäre Nukleinsäuren bezeichnet sekundäre Nukleinsäuren sowie diejenigen Nukleinsäuremoleküle, die aus den sekundären Nukleinsäuren nach dem Verfahren der Polymerasekettenreaktion im Schritt (a5) gebildet werden. Hierbei ist es wichtig, daß Oberfläche und der die Oberfläche umgebende flüssige Reaktionsraum frei von zu amplifizierenden Nukleinsäuren sind, die nicht irreversibel an die Oberfläche immobilisiert sind. Durch die Amplifikation entstehen in der Regel regelrechte Inseln, das heißt diskrete Bereiche auf der Oberfläche, die tertiäre Nukleinsäuren der gleichen Sorte, das heißt identische oder hierzu komplementäre Nukleinsäuremoleküle, tragen.

10

15 In Schritt (b) werden die tertiären Nukleinsäuren so behandelt, daß die Produkte nur mit dem 5'-Ende eines Stranges eines Doppelstranges mit der Oberfläche verbunden sind („halbseitiges Lösen“). Dies kann dadurch erfolgen, daß die tertiären Nukleinsäuren unter Spaltung, insbesondere durch Restriktion mit einer Restriktionsendonuklease, von Nukleinsäuredoppelsträngen an einer Seite von der Oberfläche gelöst werden, während die andere Seite mit der Oberfläche verbunden bleibt. Dies bedeutet, daß die doppelstängige Nukleinsäure nur über einen Nukleinsäurestrang mit der Oberfläche verbunden ist. Am einfachsten geschieht dies durch Inkubation mit einer Restriktionsendonuklease, deren Erkennungsstelle in einen Primer des in Schritt (a1) eingesetzten Primerpaars integriert wurde oder sich mit statistisch hinreichend hoher Wahrscheinlichkeit an mindestens einer anderen Stelle innerhalb der Nukleinsäuremoleküle befindet. Hierbei handelt es sich bevorzugt um eine Restriktionsendonuklease vom Typ IIS, deren Schnittstelle außerhalb der Primersequenz liegt und die einen 3'-Überhang, einen 5'-Überhang oder ein sogenanntes glattes Ende (*blunt end*) erzeugt. Die Erzeugung eines 5'-Überhangs ist bevorzugt. Insofern kann Schritt (b) und Schritt (c) durch eine einzelne Restriktionsspaltung realisiert werden, was besonders bevorzugt ist. Der das „halbseitige Lösen“ bewirkende Restriktionsschnitt kann also im Bereich einer Primersequenz, im daran angrenzenden Bereich oder im Innern der von den Primersequenzen flankierten tertiären Nukleinsäuren erfolgen. Man kann zunächst in Nachbarschaft der Primersequenz eines Primers eines Primerpaars schneiden und das erfindungsgemäße Verfahren auf diese Art ausführen und einen anderen Versuch mit einer anderen Oberfläche, die aber die gleichen tertiären Nukleinsäuren aufweist, das erfindungsgemäße Verfahren ebenso ausführen, allerdings mit der Abwandlung, daß nun in der Nachbarschaft der Primersequenz des anderen Primers eines Primerpaars, des Gegenprimers geschnitten wird. Eine solche Maßnahme hat den Vorteil, daß der weiter unten be-

25

30

35

schriebene Prozeß der Sequenzierung erst am einen, dann am anderen Ende einer tertiären Nukleinsäure angewendet werden kann, was die erzielbare Leseweite näherungsweise verdoppelt, wenn die flankierenden Primersequenzen unterschiedlich und in bezug auf eine tertiäre Nukleinsäure in derselben Orientierung angeordnet sind. Dabei ist es natürlich
5 vorteilhaft, überlappende Bereiche zu ermitteln und die Sequenzinformation auf diese Weise einer tertiären Nukleinsäure zuzuordnen.

Es ist aber auch möglich, das „halbseitige Lösen“ auf andere Weise zu erzielen, beispielsweise durch chemische Spaltung der Bindung zwischen einem der Primer des in Schritt (a1) eingesetzten Primerpaars und der Oberfläche.

10 Weiterhin kann eine im Ergebnis ähnliche Maßnahme ergriffen werden, bei der die tertiären Nukleinsäuremoleküle denaturiert und durch Bereitstellung von Gegensträngen tertiärer Nukleinsäuren zum Doppelstrang ergänzt werden.

Gegenstränge der tertiären Nukleinsäuren (GTN) können zum Beispiel durch eine von drei Maßnahmen bereitgestellt werden, die im folgenden aufgeführt werden:

15 - Zum einen können in Schritt (a1) Primermoleküle oder gegebenenfalls in Schritt (a1 oder a2) Nukleinsäuremoleküle (des Nukleinsäuregemischs) mit flankierenden Sequenzabschnitten verwendet werden, die selbstkomplementäre Bereiche aufweisen und somit zur intramolekularen Basenpaarung in der Lage sind, was sich in einer sogenannten Hairpinstruktur äußert (siehe auch Fig. 3:
20 Ligation von „maskierten Hairpins“ in Form doppelsträngiger Linkermoleküle). Hierbei ist bevorzugt nur ein Primer eines Primerpaars oder nur ein flankierender Sequenzabschnitt von zweien zur Ausbildung einer Hairpinstruktur in der Lage, um sicherzustellen, daß der Einbau von Nukleotiden nur an einem von zwei komplementären Nukleinsäuremolekülen erfolgt, so daß eine Interferenz
25 der Sequenzsignale beider Nukleinsäuremoleküle ausgeschlossen ist.

Die in Schritt (a5) gebildeten tertiären Nukleinsäuren weisen dann im einzelsträngigen Zustand, der durch Entfernung eines der beiden Stränge unter denaturierenden Bedingungen herbeigeführt wird, in der Nähe ihres 3'-Terminus eine Rückfaltung in Form eines Hairpins auf. Bevorzugterweise reicht der doppelsträngige Anteil des Hairpins bis einschließlich zur letzten Base des 3'-
30 Endes, so daß besagter Hairpin unmittelbar als Substrat für eine zur Sequenzierung eingesetzte Polymerase dienen kann. Dies ist durch geeignete Wahl der Sequenz der Primermoleküle bzw. der die Nukleinsäuremoleküle flankierenden Sequenzabschnitte zu gewährleisten.

35 Zweitens können GTN in Form von Hairpins durch Ligation von Oligonukleotiden bereitgestellt werden, die zur Hairpinbildung befähigt sind und gegebenenfalls (aber nicht notwendigerweise) bereits in Gestalt von Hairpins zur Li-

gation eingesetzt werden (siehe auch Fig. 2). Dies kann so geschehen, daß die tertiären Nukleinsäuren im doppelsträngigen (das heißt nicht denaturiertem) Zustand geschnitten und auf diese Weise einseitig von der Oberfläche abgetrennt werden. Bevorzugterweise geschieht dies durch Inkubation mit einer Restriktionsendonuklease, welche in genau einer der aus einem der beiden Primer stammenden Sequenzen (Primersequenzen) oder in einer an diese Primersequenzen angrenzenden Sequenzen eine Erkennungsstelle aufweist. Nach erfolgtem Restriktionsschnitt ragt dann ein freies Ende der tertiären Nukleinsäuren in den Lösungsraum, welches je nach verwendeter Restriktionsendonuklease ein überhängendes Ende voraussagbarer Sequenz besitzt und an welches das Oligonukleotid hybridisiert und ligiert werden kann. Besonders geeignet wäre hierfür ein Oligonukleotid, welches bereits eine Hairpinstruktur ausgebildet hat, demnach also partiell doppelsträngig vorliegt, und einen zum freien Ende der tertiären Nukleinsäuren komplementären Überhang besitzt. Um zu gewährleisten, daß eine Ligation ausschließlich an den irreversibel immobilisierten Strang des Doppelstrangs der tertiären Nukleinsäuren stattfindet, kann das 5'-Ende des Oligonukleotids eine Phosphatgruppe tragen, während das 3'-Ende des irreversibel immobilisierten Strangs sowie das 5'-Ende des mit diesem hybridisierten Gegenstrangs eine OH-Gruppe aufweisen (siehe Fig. 2, Schritte 1 und 2). Nach erfolgter Ligation wird der nicht irreversibel immobilisierte Strang der tertiären Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen entfernt. Alternativ hierzu könnte auch, wie in der US-A 5 798 210 vorgeschlagen (siehe dort insbesondere Fig. 7), eine Ligation eines zum Hairpin rückgefalteten Oligonukleotids an den einzelsträngig vorliegenden immobilisierten Strang der tertiären Nukleinsäuren vorgenommen werden. Problematisch ist bei dieser zweiten Maßnahme, daß eine oft beobachtete unzureichende Effizienz des Ligationsschritts vor der Sequenzierung nicht mehr wie bei der ersten Maßnahme durch Amplifikationsschritte kompensiert werden kann. Dies kann dann eine zu geringe Signalstärke bei der nachfolgenden Sequenzierung zur Folge haben.

30

- Drittens ist es auch möglich, Oligonukleotide, die nicht zur Ausbildung einer Hairpinstruktur in der Lage sind, mit den tertiären Nukleinsäuren unter Ausbildung von GTN zu hybridisieren (vgl. US-A 5 798 210, Fig. 8).

35

Im Rahmen der beschriebenen Maßnahmen spielt die Länge der Oligonukleotide eine untergeordnete Rolle. In der Regel werden die Oligonukleotide eine Länge von kleiner 100 oder von kleiner 50 Nukleotidbausteinen aufweisen, so daß man auch allgemein von Nukleinsäuren (hier: polymere Nukleotide, die mehr als drei Nukleotidbausteine umfassen) sprechen kann. Einzelsträngige Oligonukleotide einer Länge von größer 45

Nukleotidbausteinen sind infolge unspezifischer Wechselwirkungen nur schwer handhabbar, wenn sie keine Sequenz aufweisen, die Hairpins ermöglicht. Durch die Fähigkeit, Hairpins auszubilden, werden unspezifische Wechselwirkungen durch Konkurrenz vermindert. Werden doppelsträngige Oligonukleotide eingesetzt, dann spielt folglich die Länge der Oligonukleotide kaum eine Rolle (siehe auch Fig. 3).

Alle beschriebenen Maßnahmen haben zur Folge, daß die tertiären Nukleinsäuren einen doppelsträngigen Teilbereich aufweisen, der eine Strangverlängerung an den Gegensträngen der tertiären Nukleinsäuren (GTN) durch eine DNA-Polymerase oder Reverse Transkriptase ermöglicht.

Am Ende eines solchen Verfahrensschritts weist in der Regel jede der in Schritt (a) durch das Verfahren der Polymerasekettenreaktion bereitgestellten Inseln tertiärer Nukleinsäuremoleküle Doppelstränge auf, die zur Hälfte über das 5'-Ende des einen und zur Hälfte über das 5'-Ende des anderen Stranges (nämlich des Gegenstranges) an die Oberfläche gebunden sind.

Diese unter Bereitstellung von Gegensträngen von tertiären Nukleinsäuren beschriebenen Maßnahmen haben den Vorteil, daß der weiter unten beschriebene Prozeß der Sequenzierung erst am einen, dann am anderen Ende einer tertiären Nukleinsäure angewendet werden kann, was die erzielbare Leseweite näherungsweise verdoppelt, ohne daß hierzu zwei mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen behandelte Oberflächen, die die gleichen tertiären Nukleinsäuren aufweisen, dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfen werden müssen.

Der in Schritt (c) erfolgende Schnitt mit einer Restriktionsendonuklease vom Typ IIS erfolgt bevorzugterweise derart, daß mindestens ein Teil der zu bestimmenden Sequenz in Form eines einzelsträngigen Überhangs freigelegt wird. Dieser Überhang kann ein 3'- oder ein 5'- Überhang sein. Letzteres ist bevorzugt. Allerdings ist es ebenfalls möglich, zunächst in Schritt (c) ein glattes Ende zu erzeugen, die tertiäre Nukleinsäure zu dephosphorylieren, dann in Schritt (e) eine Ligation über glatte Enden (*blunt ends*) vorzunehmen, Schritt (d) nachzuholen, wobei die Basenabfolge der betreffenden tertiären Nukleinsäure unter Verdrängung eines Stranges der tertiären Nukleinsäure (*strand displacement*) erfolgt und in Schritt (g) die Schritte (f), Dephosphorylierung der tertiären Nukleinsäure, Schritt (e) und (d) in dieser Reihenfolge zu wiederholen.

Es ist besonders bevorzugt, daß der durch den Restriktionsschnitt freizulegende Teil der Nukleinsäuremoleküle sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem bereits bekannten Teil der Nukleinsäuremoleküle befindet. Dieser bereits bekannte Teil kann beispielsweise, sofern es sich bei dem Nukleinsäuregemisch des Schritts (a1 oder a2) um eine Bibliothek von Restriktionsfragmenten handelt, eine der zur Herstellung der Bibliothek verwandten Restriktionsschnittstellen bekannter Sequenz sein.

Die Bestimmung einer oder mehrerer Basen der überhängenden Enden in **Schritt (d)** kann zum Beispiel mittels einer der folgenden Maßnahmen vorgenommen werden:

Die Bestimmung der Sequenz erfolgt in I) und II) über eine Auffüllreaktion mit Hilfe einer Nukleinsäure-Polymerase.

- (I) In einer Ausführungsform wird ein (einzelnsträngiger) **5'-Überhang** am Ende eines Doppelstrangs als Matrize zur 3'-Extension des Gegenstrangs durch eine Polymerase eingesetzt. Beträgt die Länge des einzelnsträngigen Überhangs lediglich eine Base, so können für die Primerextension markierte Nukleotide oder markierte Abbruchnukleotide wie Didesoxynukleotide eingesetzt werden. In jedem Fall ist es erforderlich, die Identität der inkorporierten Nukleotide festzustellen, was bevorzugt über eine am Nukleotid befestigte fluoreszierende Markierungsgruppe geschieht. Beträgt die Länge des einzelnsträngigen Überhangs mehr als eine Base, so setzt eine eindeutige Sequenzbestimmung die Verwendung von Abbruchnukleotiden voraus, deren Identifikation wiederum durch eine am Nukleotid befestigte Molekülgruppe geschieht.

Die Sequenzierung des entstandenen Übergangs durch entschützbare Abbruchnukleotide erfolgt bevorzugt durch die folgende Schritte

- Verlängerung des 3'-Endes des erzeugten 5'-Überhangs um ein Nukleotid, wobei
 - das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert (oder stark verlangsamt),
 - das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;
- Identifikation des eingebauten Nukleotids;
- die Entfernung der Schutzgruppe und Entfernung oder Veränderung der zur Identifikation verwendeten Molekülgruppe und
- gegebenenfalls Wiederholung der vorangegangenen Schritte, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

In diesem Zusammenhang ist auch auf US-A 5 714 330 und US-A 5 798 210 hinzuweisen. Canard und Sarfati (Gene 148 (1994) 1-6) beschreiben 3'-veresterte Nukleotide, welche ein zusammen mit der Schutzgruppe abspaltbares Fluorophor enthalten. Diese Nukleotidbausteine können mit allerdings niedriger Effizienz von verschiedenen Polymerasen in einen wachsenden Strang inkorporiert werden und wir-

ken dann als Abbruchnukleotide, lassen also keine weitere Strangverlängerung zu. Die beschriebenen Ester lassen sich alkalisch oder enzymatisch abspalten, so daß freie, weitere Nukleotidinkorporation erlaubende 3'-OH-Gruppen entstehen. Die Esterspaltung erfolgt allerdings sehr langsam (innerhalb von 2 Stunden), so daß die

5 beschriebenen Verbindungen für eine Sequenzierung längerer DNA-Abschnitte (z.B. mehr als 20 Basen) ungeeignet sind. Solange die Schutzgruppe in 3'-OH oder gegebenenfalls 2'-OH-Position gebunden ist, stellt die um dieses Nukleotid verlängerte quartäre Nukleinsäure kein Substrat mehr für eine Nukleinsäurepolymerase dar. Erst die Entfernung der Schutzgruppe macht eine weitere Verlängerung der

10 Nukleinsäure durch die Polymerase möglich. Die Schutzgruppe trägt außerdem in der Regel eine Molekülgruppe, die die Identifikation des eingebauten Nukleotids und so die Sequenzierung des wachsenden Nukleinsäurestranges ermöglicht und das Nukleotid mit der Abspaltung der Schutzgruppe verläßt. Allerdings kann die identifizierende Molekülgruppe auch an einer anderen Stelle des Nukleotids, zum

15 Beispiel an der Base, gebunden sein. In diesem Fall ist es notwendig, das Signal der identifizierenden Molekülgruppe zu löschen. Dies kann in der Regel auf zwei Arten erfolgen. Zum Beispiel im Falle eines Fluorophors kann die Molekülgruppe durch Ausbleichen verändert werden. Daneben kann die identifizierende Molekülgruppe auch entfernt werden, zum Beispiel durch photochemische Spaltung einer photolabilen Bindung. Bevorzugt trägt jeder, der für den Einbau in Frage kommenden vier

20 Nukleotidbausteine (G, A, T, C) eine andere identifizierende Molekülgruppe. In diesem Fall können die vier Sorten Nukleotide gleichzeitig angeboten werden. Tragen verschiedene oder sogar alle Nukleotide dieselbe identifizierende Gruppe, so ist der Identifizierungsschritt in der Regel vier Teilschritte zu zerlegen, in welchen die

25 Nukleotide einer Sorte (G, A, T, C) getrennt angeboten werden. Bei der Molekülgruppe handelt es sich zum Beispiel um einen Fluorophor oder um einen Chromophor. Letzterer könnte sein Absorptionsmaximum im sichtbaren oder im Infraroten Frequenzbereich haben. Die Detektion erfolgt sowohl orts- als auch zeitaufgelöst, so daß die auf der Oberfläche befindlichen Inseln von Nukleinsäuren

30 parallel sequenziert werden können. Andere Beispiele für die vorgenannte Molekülgruppe sind Biotin, Digoxigenin (DIG) oder Dinitrophenol (DNP). In diesem Fall erfolgt keine direkte, sondern eine indirekte Identifikation des eingebauten Nukleotids, indem zur Detektion inkorporierter Nukleotide eine Behandlung mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin, Anti-DIG-Ig oder Anto-DNP-Ig behandelt wird.

35 Abbruchnukleotide erlauben die vollständige Sequenzierung nahezu beliebig langer einzelsträngiger 5'-Überhänge, indem der Prozeß bestehend aus Einbau, Identifikation, Entschützen (d.h. Freisetzen der Schutzgruppe und Entfernung der Markierungsgruppe) der Abbruchnukleotide solange wiederholt wird, bis die gewünschte

Leseweite erreicht ist oder bis gegebenenfalls eine Asynchronizität zwischen den zur Sequenzierung gehörigen Vorgängen an identischen Nukleinsäuremolekülen eintritt, welche die Generation einheitlicher und eindeutig zu interpretierender Signale verhindert.

5

Eine Alternative zur Entschützung von Abbruchnukleotiden ist der Austausch inkorporierter Didesoxynukleotide durch Inkubation des Einbauprodukts mit einer Polymerase mit Exonukleaseeigenschaften (*proofreading*-Aktivität) sowie regulären Nukleotidbausteinen, so daß durch Endauffüllung ein glattes Strangende gebildet wird. Im Falle einer vorausgegangenen Linkerligation wird hierbei einer der beiden Linkerstränge via *strand displacement* durch den neu synthetisierten Strang ersetzt.

10

II) Ferner kann wie unter I) vorgegangen werden, wobei allerdings statt eines 5'-Überhangs ein 3'-Überhang erzeugt wird. Hierbei kann an den 3'-Überhang ein Linkermolekül mit hierzu mindestens teilweise komplementärem, jedoch kürzerem Überhang hybridisiert und gegebenenfalls ligiert werden, so daß der aus Nukleinsäuremolekül und Linkermolekül gebildete Doppelstrang eine interne einzelsträngige Region, eine „Lücke“, aufweist (siehe Fig. 10 und 11). Die Primerextension findet dann in Form einer Verlängerung des entsprechenden Linkerstrangs statt. Die Sequenzierung des entstandenen Übergangs kann durch entschützbare Abbruchnukleotide erfolgen (siehe Fig. 11) und umfaßt dann die folgende Schritte

15

20

- Verlängerung des 3'-Endes des mit dem 5'-Überhang verbundenen Linkers um ein Nukleotid, wobei

25

- das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert (oder stark verlangsamt),
- das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;

30

- Identifikation des eingebauten Nukleotids;
- Entfernung der Schutzgruppe und Entfernung oder Veränderung der zur Identifikation verwendeten Molekülgruppe und
- gegebenenfalls die Wiederholung der vorangegangenen Schritte, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.

35

Um auf beschriebene Weise einen Doppelstrang mit interner einzelsträngiger Region zu erzeugen, muß der zurückstehende Linkerstrang eines Linkers mit Überhang, vor der Ligation an seinem 5'-Ende phosphoryliert werden. Auch im Falle eines 3'-

Überhangs besteht eine Alternative zur Inkorporation entschützbarer Abbruch-
nukleotide im Einbau von markierten Didesoxynukleotiden, welche anschließend
mittels einer *proofreading*-Polymerase unter Strangverlängerung und *strand displa-*
cement des Gegenstrangs ersetzt werden (siehe unter I)). Danach wird jeweils mit
5 einem Typ IIS-Enzym geschnitten, um einen Überhang für die nächste Sequenzier-
runde wiederherzustellen. Im Anschluß daran werden die tertiäre Nukleinsäurem
dephosphoryliert, damit, wenn im Anschluß daran die Ligation der betreffenden
tertiären Nukleinsäure mit den Linker über glatte Enden (*blunt ends*) erfolgt, ein
„*nick*“, also ein Bruch des Zuckerphosphat-Rückgrats innerhalb eines Nukleinsäu-
redoppelstrangs resultiert, so wie das z.B. in Fig. 11 Nr. 4 und 5 gezeigt ist.

III) Alternativ kann die Sequenzierung durch Ligation erfolgen. Hierbei wird die Se-
quenz der überhängenden Enden in Schritt (d) durch eine Ligation der tertiären Nu-
kleinsäure mit einem Linker bestimmt werden, welcher seinerseits einen ganz oder
15 teilweise zu den zu sequenzierenden Überhängen der Nukleinsäuremoleküle kom-
plementären Überhang aufweist und welcher die Identifikation einer oder mehrerer
Basen der zu sequenzierenden Überhänge erlaubt. In diesem Fall werden Schritte
(d) und (e) zusammen durchgeführt (siehe Fig. 12). Beispielsweise kann wie in US-
A 5 714 330 beschrieben mittels Ligation durch eine Ligase, welche bevorzugt Hy-
bride zueinander vollständig komplementärer Enden ligiert, beispielsweise DNA-
20 Ligase aus *E.coli*, an einen gegebenen Überhang, bevorzugt eines aus einer Aus-
wahl verschiedener Linkermoleküle, welche sich in ihrem Überhang voneinander
unterscheiden, ligiert werden. In diesem Fall kann aus der Natur der entstandenen
Ligationsprodukte auf eine oder mehrere Basen des zu sequenzierenden Überhangs
rückgeschlossen werden. Hierbei kann das durch Ligation mit dem Nukleinsäure-
molekül verbundene Linkermolekül beispielsweise durch eine oder mehrere Mar-
25 kierungsgruppen identifiziert werden. Alternativ zur Ligation eines doppelsträngi-
gen Linkermoleküls kann auch zunächst ein erstes einzelsträngiges DNA-Molekül
mit dem Überhang des zu sequenzierenden Nukleinsäuremoleküls hybridisiert und
durch Ligation befestigt werden, dann in einem nächsten Schritt ein weiteres, zum
ersten DNA-Molekül ganz oder teilweise komplementäres zweites DNA-Molekül
30 an den überhängenden Teil des ersten DNA-Moleküls hybridisiert und erneut Liga-
tionsbedingungen ausgesetzt werden, wobei eine Ligation nur im Falle eines voll-
ständig zum Gegenstrang komplementären 3'-Endes besagten zweiten DNA-
Moleküls stattfindet. Die Natur des ligierten zweiten DNA-Moleküls, etwa eine
enthaltene Markierungsgruppe, erlaubt dann die Identifikation einer oder mehrerer
35 Basen des zu sequenzierenden Überhangs. Um im Zuge der Ligation eine Verknüp-
fung beider Stränge zu gewährleisten, muß dafür Sorge getragen werden, daß der
mit seinem 5'-Ende an das Nukleinsäuremolekül zu ligierende Linkerstrang an sel-

bigem Ende in phosphorylierter Form vorliegt. In jedem Fall ist auch hier bevorzugt, daß der aus dem ersten und dem zweiten DNA-Molekül gebildete doppelsträngige Bereich eine Erkennungsstelle für eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease enthält.

5

Das Linkermolekül in Schritt (e) stellt ein mindestens teilweise doppelsträngiges Stück Nukleinsäure dar. Am einfachsten wird ein Linker durch die Hybridisierung zweier mindestens abschnittsweise zueinander komplementärer Oligonukleotide hergestellt. Ebenfalls möglich ist der Einsatz eines Linkers, der zur intramolekularen Rückfaltung fähig ist (Ausbildung einer Haarnadelstruktur). Bevorzugterweise weisen die Linker ein zur Ligation befähigtes, beispielsweise glattes Ende sowie ein nicht zur Ligation an das bereitgestellte Fragmentende befähigtes Ende auf, welches beispielsweise durch einen nicht-palindromischen Überhang oder eine mehrbasige Fehlpaarung (*mismatch*) gekennzeichnet sein kann. Es ist möglich, den Linker an seinem zur Ligation befähigten Ende mit einer

10

15

Phosphatgruppe zu versehen (siehe II). In jedem Fall soll der Linker die Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuklease vom Typ IIS tragen.

In Schritt (f) werden die tertiären Nukleinsäuren erneut mit einer oder mehreren Typ IIS-Restriktionsendonukleasen geschnitten, deren Erkennungsstellen in den in Schritt (e) befestigten Linkermolekülen liegen und welche 3'-überhängende Enden oder 5'-überhängende Enden erzeugen. Hierbei ist bevorzugt, daß der durch Schritt (f) freigelegte Überhang der tertiären Nukleinsäuren unmittelbar an den zuvor in Schritt (d) sequenzierten Bereich der tertiären Nukleinsäuren grenzt.

20

In Schritt (g) werden die Schritte (d), (e) und (f) in beliebiger Reihenfolge wiederholt, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist. Die Reihenfolge der Schritte bestimmt sich nach der Spaltcharakteristik der in Schritt (c) und (f) verwendeten Typ IIS-Restriktionsendonukleasen. Weiterhin werden die für jede der in Schritt (a) bereitgestellten Inseln in aufeinanderfolgenden Zyklen, jeweils bestehend aus den Schritten (d) bis (f), erhaltenen Sequenzinformationen zu für jede Insel zusammenhängende Sequenzinformationen zusammengeführt, wobei vorzugsweise die Sequenzinformation verschiedener Inseln parallel ermittelt wird. Grenzt der in einem gegebenen Zyklus sequenzierte Bereich an den im vorherigen Zyklus sequenzierten Bereich, so ergibt sich die gesamte Leseweite aus dem Produkt aus Zyklenzahl und Zahl der pro Zyklus bestimmten Basen.

25

30

35

Das erfindungsgemäße Verfahren kann durch die nachfolgenden Ausführungsformen näher ausgestaltet werden.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Schritt (b) und/oder Schritt(c) durch Spaltung der tertiären Nukleinsäuren mit Hilfe einer Restriktion-

sendonuklease, die durch Spaltung einen 5'-Überhang - oder in einer anderen Ausführungsform - einen 3'-Überhang erzeugt, verwirklicht.

5 In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (a1) Primer oder Nukleinsäuremoleküle mit flankierenden Sequenzabschnitten verwendet, von denen mindestens ein Primer eines Primerpaars mindestens eine Restriktionsschnittstelle aufweist und eine dieser Restriktionsschnittstellen für die vorgenannte Restriktionsspaltung benutzt wird.

10 Wird durch die Restriktionsspaltung ein 5'-Überhang erzeugt, so kann Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens durch die nachfolgenden Schritte ausgestaltet werden:

(d1) Verlängerung des 3'-Endes des erzeugten 5'-Überhangs um ein Nukleotid, wobei

- 15 - das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert (oder stark verlangsamt),
- das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;

(d2) Identifikation des eingebauten Nukleotids;

20 (d3) Entfernung der Schutzgruppe und Entfernung oder Veränderung der zur Identifikation verwendeten Molekülgruppe;

(d4) gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (d1) bis (d3).

Hierbei werden in der Regel die Schritte (d1) bis (d3) solange wiederholt, bis der Überhang aufgefüllt ist. In diesem Fall erfolgt in dem nachfolgenden Schritt (e) die Ligation eines Linkers über glatte Enden, so wie dies in Fig. 9 beschrieben ist.

25 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, in welchem durch die Restriktionsspaltung ein 3'-Überhang erzeugt wird, wird die Reihenfolge der Schritte (d) und (e) vertauscht und Schritt (d) durch die folgende Schritte verwirklicht:

(d1) Verlängerung des 3'-Endes des mit dem 5'-Überhang verbundenen Linkers um ein Nukleotid, wobei

- 30 - das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert (oder stark verlangsamt),
- das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;

(d2) Identifikation des eingebauten Nukleotids;

(d3) Entfernung der Schutzgruppe und Entfernung oder Veränderung der zur Identifikation verwendeten Molekülgruppe;

(d4) gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (d1) bis (d3).

Diese Ausführungsform ist in Fig. 10 beschrieben. Durch die Wiederholung der Schritte (d1) bis (d4) kommt es zur Verdrängung eines Stranges des Doppelstranges der tertiären Nukleinsäure (sogenanntes *strand displacement*). In Schritt (f) erfolgt eine oder mehrere Restriktionsspaltung mit einer Typ IIS-Restriktionsendonuklease, die Sequenzabschnitte erkennen, die in Schritt (e) durch die Linkermoleküle in die tertiären Nukleinsäuren eingeführt worden sind. Anschließend erfolgt Schritt (g), das heißt die Schritte (e), (d) und (f) werden in dieser Reihenfolge sooft wiederholt, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten wurde.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in Schritt (a1) die Primermoleküle durch Ausbildung einer kovalenten Bindung an eine Oberfläche irreversibel immobilisiert.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt in Schritt (d2) die Base die Molekülgruppe, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt in Schritt (d1) das Nukleotid an der 3'-OH-Position die Schutzgruppe.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt in Schritt (d1) das Nukleotid an der 2'-OH-Position die Schutzgruppe.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist in Schritt (d1) die Schutzgruppe eine spaltbare Silylether, Ester-, Ether-, Anhydrid- oder Peroxid-Gruppe oder eine Sauerstoff-Metall-Gruppe auf.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in Schritt (d3) die Entfernung der Schutzgruppe durch ein komplexbildendes Ion, vorzugsweise durch Cyanid, Thiocyanat, Fluorid oder Ethylendiamintetraacetat.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in Schritt (d3) die Schutzgruppe photochemisch abgespalten.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist in Schritt (d1) die Schutzgruppe einen Fluorophor auf und in Schritt (d2) das Nukleotid fluorometrisch identifiziert.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Schritte (d) und (e) durch die Ligation indentifizierbarer Linker an die tertiären Nukleinsäuren verwirklicht. Diese Ausführungsform ist unter III) beschrieben. Die Bestimmung der Basenabfolge erfolgt unter Ausnutzung der Spezifität der Ligase. Aus der Natur der Liagti-
onsprodukte wird auf die Basenabfolge geschlossen.

10

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird weiterhin eine Vorrichtung bereitgestellt, mit folgenden Bestandteilen:

- eine Reaktionskammer in Form einer Durchflußzelle,
- mindestens eine Lichtquelle zur Anregung von zur Markierung eingesetzten Fluo-
15 rophoren,
- eine Vorrichtung zum Scannen der Oberfläche in XY-Richtung,
- mindestens ein Photodetektor zur Messung der emittierten Fluoreszenz-strahlung,
- gegebenenfalls mindestens ein Gefäß für Reaktionslösungen und Abfall,
- gegebenenfalls ein elektronischer Rechner, welcher die gemessene Fluoreszenzinten-
20 sität in Abhängigkeit von der Position auf der Oberfläche speichert sowie die so erhal-
tenen Datensätze gegebenenfalls weiterverarbeitet.

Die Reaktionskammer enthält die Oberfläche, an welcher die beschriebenen Prozesse zur Sequenzierung sowie gegebenenfalls zuvor zur Amplifikation stattfinden. Beispielsweise
25 kann besagte Oberfläche gleichzeitig als Wand, bevorzugt als die obere oder untere Wand, der Reaktionskammer dienen. Hierbei muß die Kammer zur Beobachtung der an der Oberfläche stattfindenden Prozesse mindestens teilweise transparent ausgeführt sein. Um geeignete Reaktionsbedingungen herstellen zu können, ist die Reaktionskammer bevorzugter-
weise temperierbar ausgestaltet, beispielsweise mittels eines Peltier-Elements. Dabei ist es
30 insbesondere bevorzugt, die Reaktionskammer durch an sich bekannte Methoden mit einer Temperierung zu versehen, die in Hinblick auf Toleranz und Ansprechverhalten und anderen Kriterien den hohen Anforderungen der Festphasen-Polymerasekettenreaktion (siehe Schritt e) entspricht, um alle Verfahrensschritte der erfindungsgemäßen Verfahrens mit nur einer Apparatur durchführen zu können.

35

Weiterhin besitzt die Reaktionskammer mindestens je einen Zu- und Ablauf, durch die verbrauchte oder nicht mehr benötigte Reaktionslösung gegen frische oder eine andere Lösung ausgetauscht werden kann. Zu- und Ablauf sind in der Regel durch geeignete Schlauch- oder Rohrleitungen mit einem oder mehreren Vorratsgefäßen bzw. Abfallgefä-

Ben verbunden, welche zur Aufnahme frischer oder gebrauchter Lösungen dienen und welche ihrerseits temperierbar ausgeführt sein können. Weiterhin weist die beschriebene Apparatur bevorzugterweise mindestens eine Vorrichtung zur Förderung von Flüssigkeiten auf, welche beispielsweise als Schlauchpumpe ausgeführt sein kann und dem Lösungsaustausch dient. Schließlich erhält das Lumen der Reaktionskammer eine Form, welche einen
5 möglichst effizienten Lösungsaustausch begünstigt.

Die Lichtquelle emittiert bevorzugt monochromatisches Licht einer Wellenlänge, welche so nahe wie möglich am Absorptionsmaximum des zur Sequenzierung verwendeten Fluorophors bzw. der Fluorophore liegt. Hierfür sind Laser geeigneter Wellenlänge bevorzugt,
10 jedoch können auch andere Lichtquellen, beispielsweise Quecksilberdampf lampen, eingesetzt werden.

Die Vorrichtung zum Scannen der in der Reaktionskammer befindlichen Oberfläche kann als XY-Tisch ausgebildet sein, welcher die Reaktionskammer trägt und senkrecht zur Einstrahlungsrichtung bewegt, so daß der gesamte Bereich besagter Oberfläche abgetastet werden kann. Alternativ hierzu ist es möglich, die Reaktionskammer ortsfest zu halten und stattdessen den zur Anregung verwandten Lichtstrahl so abzulenken, daß er die gesamte
15 Oberfläche abzutasten vermag. Es ist ebenfalls denkbar, die Reaktionskammer in nur eine
20 Richtung beweglich auszubilden und den Anregungslichtstrahl in hierzu senkrechter Richtung abzulenken.

Der Photodetektor soll eine zur Detektion der emittierten Fluoreszenzstrahlung geeignete Empfindlichkeit aufweisen, andererseits bei der gleichzeitigen Verwendung verschiedener
25 Fluorophore eine zuverlässige Unterscheidung derselben erlauben. Geeignet sind beispielsweise Photomultiplier oder Avalanche-Dioden, welchen zur Ausblendung unerwünschter Strahlung gegebenenfalls geeignete optische Filter bzw. Strahlenteiler vorgeschaltet sein können.

Als elektronischer Rechner eignen sich beispielsweise handelsübliche Windows-, Macintosh- oder Unix-basierte Systeme. Es ist bevorzugt, daß besagter Rechner für jeden einzelnen Sequenzierungsschritt, bestehend aus der Identifikation jeweils einer Base pro "Insel" identischer tertiärer Nukleinsäuremoleküle, zunächst einen "horizontalen" Datensatz generiert, welcher Fluoreszenzintensität sowie ggf. detektierte Wellenlänge und/oder Fluoreszenzlebensdauer und Position korreliert. Nach Aufnahme der gewünschten Zahl horizontaler Datensätze, entsprechend der gewünschten Leseweite, ist weiterhin die Generation eines "vertikalen" Datensatzes bevorzugt, indem jeder Position der horizontalen Datensätze Sequenzierungsschritt für Sequenzierungsschritt die jeweils an dieser Position gemessene Fluoreszenzintensität sowie ggf. detektierte Wellenlänge und/oder Fluoreszenzlebens-
35

dauer zugeordnet wird. Schließlich ist bevorzugt, derart erhaltene vertikale Datensätze anhand des Sequenzierungsprotokolls und der zur Markierung verwendeten Fluorophore in Sequenzinformation der einzelnen Inseln zu übersetzen.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die nach dem erfindungsmäßigen Verfahren hergestellten festphasengekoppelten Bibliotheken von Nukleinsäure-molekülen.

Die Erfindung wird durch die Zeichnung näher beschrieben.

Es zeigt

- 10 **Fig. 1** die Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle mittels Oberflächen-gebundener Primer zu Inseln aus jeweils identischen amplifizierten Nukleinsäuremolekülen;
- Fig. 2** die Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte;
- Fig. 3** die Bereitstellung von Gegensträngen von tertiären Nukleinsäuren durch Ausbildung einer Hairpinstruktur in Sequenzabschnitten, die Linker entstammen;
- 15 **Fig. 4** die parallele Sequenzierung an einer Oberfläche;
- Fig. 5** die Assemblierung der Detektions- und Identifikationsergebnisse zu zusammenhängenden Sequenzen;
- Fig. 6** die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Anwendung in der Expressionsanalyse;
- 20 **Fig. 7** die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Sequenzierung genomischer Klone,
- Fig. 8** das Ergebnis der Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle gemäß Fig. 1
- Fig. 9:** Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte;
- Fig. 10:** Eine weitere alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte;
- 25 **Fig. 11:** Eine weitere alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte;
- Fig. 12:** Eine weitere alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte;
- 30 **Fig. 13:** Eine Vorrichtung zur Durchführung paralleler Sequenzierungen

Fig. 1 zeigt die Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle mittels Oberflächen-gebundener Primer zu Inseln aus jeweils identischen amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, wobei im einzelnen

- 35 1 die irreversible Immobilisierung von ein Primerpaar bildenden Oligonukleotiden,
- 2 die Hybridisierung der primären Nukleinsäuren mit den Oberflächen-gebundenen Primern,
- 3 die Bildung sekundärer Nukleinsäuren durch Strangverlängerung der Primer.

- 4 die Entfernung der nicht irreversibel gebundenen primären Nukleinsäuremoleküle und Amplifikation der sekundären Nukleinsäuren,
- 5 Inseln mit jeweils identischen tertiären Nukleinsäuremoleküle bezeichnet.

5 **Fig. 2** veranschaulicht die Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte, wobei

- 1 das Lösen der Amplifikationsprodukte durch Restriktionsdau der Amplifikationsprodukte (Unterstrichen: die Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *SphI*);
- 10 2 die Dephosphorylierung;
- 3 die Ligation eines Hairpin-Oligonukleotids (fett)
- 4 die Entfernung des nicht irreversibel immobilisierten Nukleinsäurestrangs;
- 5 den Einbau und Identifikation eines ersten geschützten Nukleotids;
- 6 die Entfernung von Schutzgruppe und Markierungsgruppe unter Wiederherstellung einer freien 3'-OH-Gruppe;
- 15 7 den Einbau und Identifikation eines zweiten geschützten Nukleotids;
- 8 die Wiederholung der Schritte 5 und 6 zeigt.

Fig. 3 zeigt die Bereitstellung eines GTN durch Ausbildung einer Hairpinstruktur in Sequenzabschnitten die Linker entstammen. Die zu sequenzierende Nukleinsäure (Restriktionsfragment mit zwei unterschiedlichen Enden, eines hiervon durch die Restriktionsendonuklease *NlaIII* erzeugt) ist grau hinterlegt. CATG, durch Restriktionsendonuklease *NlaIII* generierter Überhang; GCATGC, Erkennungsstelle für Restriktionsendonuklease *SphI* (enthält die Erkennungsstelle für *NlaIII*, CATG); NNNNNNNNNN und
 25 MMMMMMMMMM, „inverted repeats“ (zueinander komplementäre Sequenzen, die intramolekulare Rückfaltung eines Einzelstrangs erlauben); XXXXX und YYYYY, Spacerregion zur Oberfläche. Im einzelnen beschreibt

- 1 die Ligation eines Linkers mit „inverted repeat“ und *SphI*-Schnittstelle an zu sequenzierendes Fragment;
- 30 2 die Denaturierung und Hybridisierung mit an einer Oberfläche immobilisiertem Primer;
- 3 die Amplifikation mit zwei an Oberfläche immobilisierten Primern (Gegenprimer nicht gezeigt);
- 4 das „halbseitige Lösen“ der Amplifikationsprodukte von der Oberfläche durch Restriktionsendonuklease *SphI* (Pfeile);
- 35 5 die Denaturierung und Entfernung des nicht an der Oberfläche immobilisierten Strangs ;
- 6 die Renaturierung unter Ausbildung eines Hairpins, Beginn der Sequenzierung durch Inkorporation entschützbarer Abbruchnukleotide.

Fig. 4 beschreibt die parallele Sequenzierung an einer Oberfläche. „Inseln“ identischer Nukleinsäuremoleküle sind in dieser Figur vereinfacht durch einen einzigen Strang symbolisiert. Im einzelnen zeigt

- 5 1 die Befestigung eines Sequenzierprimers, Einbau des ersten Abbruchnukleotids und parallele Detektion und Identifikation des jeweils ersten Nukleotidbausteins,
- 2 die Entfernung von Schutzgruppe und Markierungsgruppe des ersten Nukleotids, Einbau des zweiten Abbruchnukleotids und parallele Detektion und
- 10 Identifikation des jeweils zweiten Nukleotidbausteins;
- 3 das Detektions- und Identifikationsergebnis der ersten Base;
- 4 das Detektions- und Identifikationsergebnis der zweiten Base.

Fig. 5 beschreibt die Assemblierung der Detektions- und Identifikations-ergebnisse zu
15 zusammenhängenden Sequenzen, wobei

- 1 die Detektions- und Identifikationsergebnis der ersten Base,
- 2 die Detektions- und Identifikationsergebnis der zweiten Base,
- 3 die Detektions- und Identifikationsergebnis der n-ten Base,
- 4 die assemblierten Sequenzen der Nukleinsäuremoleküle in einzelnen Inseln
- 20 bezeichnet.

Fig. 6 zeigt die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Anwendung in der Expressionsanalyse, wobei im einzelnen

- 1 die cDNA-Synthese mit biotinyliertem Primer, Bindung der doppelsträngigen cDNA an Streptavidin-beschichtete Oberfläche;
- 25 2 den Restriktionsschnitt mit dem ersten Enzym (RE1), Fortwaschen der freigesetzten Fragmente, und den zweiter Restriktionsschnitt mit dem zweiten Enzym (RE2);
- 3 die Ligation zweier verschiedener Linker;
- 4 mRNA;
- 30 5 doppelsträngige an Festphase immobilisierte cDNA;
- 6 ein cDNA-Fragment, das von zwei verschiedenen „überhängenden“ Enden flankiert wird,
- 7 ein von zwei verschiedenen Linkern (L1, L2) flankiertes cDNA-Fragment zeigt.

Fig. 7 zeigt die Bereitstellung primärer Nukleinsäuren zur Sequenzierung genomischer Klone, wobei im einzelnen

- 1 einen Restriktionsschnitt eines genomischen Klons parallel mit jeweils zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (RE1-4), Ligation verschiedener Linker (L1-4);
- 2 einen genomischen Klon;
- 3 zwei überlappende Sätze mit Linkern ligierter Fragmente bezeichnet.

Symmetrisch von identischen Linkern flankierte Fragmente (durchgestrichen) lassen sich nicht sequenzieren.

10

Fig. 8 zeigt das Ergebnis der Amplifikation einzelner Nukleinsäuremoleküle mittels Oberflächen-gebundener Primer zu Inseln aus jeweils identischen amplifizierten Nukleinsäuremolekülen, visualisiert durch Anfärbung mit SYBR Green I.

- 15 **Fig. 9** zeigt eine alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte mittels entschützbarer Abbruchnukleotide und Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS, wobei im einzelnen

- 1 die Inkorporation eines ersten markierten entschützbaren Abbruchnukleotids durch Strangverlängerung an einem 5'-Überhang;
- 2 die Identifikation des inkorporierten Nukleotids, Entfernung der Schutzgruppe und Inkorporation eines zweiten markierten entschützbaren Abbruchnukleotids;
- 3 die Wiederholung von Inkorporation und Identifikation jeweils eines entschützbaren Abbruchnukleotids sowie Entfernung der Schutzgruppe, bis 5'-Überhang zu glattem Ende aufgefüllt ist, sodann nochmals Schutzgruppenentfernung;
- 4 die Ligation eines Linkers mit einem glatten und einem nicht glatten Ende (Überhang oder *mismatch*) sowie einer Erkennungsstelle (schattiert) für eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease;
- 5 die Inkubation mit besagter IIS-Restriktionsendonuklease;
- 6 die Wiederholung von Schritt 1;
- 7 die Wiederholung der Schritte 2 bis 5 zeigt.

- 35 **Fig. 10** zeigt eine weitere alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte mittels Abbruchnukleotiden und Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS, wobei im einzelnen

- 1 die Ligation eines Linkermoleküls an einen 3'-Überhang, welches eine Erkennungsstelle (schattiert) für eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease enthält;
- 2 die Inkorporation und Identifikation eines Abbruchnukleotids;
- 5 3 die Entfernung des Abbruchnukleotids durch Inkubation mit einer Polymerase mit *proofreading*-Aktivität sowie allen vier Nukleotiden, dabei beginnender Ersatz des Gegenstrangs zum zu sequenzierenden Strang durch *strand displacement*;
- 4 die vollständige Entfernung des ursprünglichen Gegenstrangs durch *strand displacement* unter Wiederherstellung eines unverzweigten Doppelstrangs;
- 10 5 die Inkubation mit einer Typ IIS-Restriktionsendonuklease, deren Erkennungsstelle im Linker vorhanden ist, gefolgt von der Dephosphorylierung der betreffenden tertiären Nukleinsäuren und von der *blunt end*-Ligation eines neuen Linkers an die tertiären Nukleinsäuren die erneute Inkorporation und Identifikation eines Abbruchnukleotids unter *strand displacement*;
- 15 6 die Wiederholung der Schritte 3 bis 6 zeigt.

Fig. 11 zeigt eine weitere alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte mittels entschützbarer Abbruchnukleotide und Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS, wobei im einzelnen

20

- 1 die Ligation eines Linkermoleküls an einen 3'-Überhang, welches eine Erkennungsstelle (schattiert) für eine Typ IIS-Restriktionsendonuklease enthält, wobei eine von doppelsträngigen Regionen flankierte einzelsträngige Region entsteht;
- 25 2 die Inkorporation, Identifikation und Schutzgruppenentfernung eines ersten markierten entschützbaren Abbruchnukleotids durch Strangverlängerung am Linkermolekül;
- 3 die mehrfache Wiederholung von Inkorporation, Identifikation und Schutzgruppenentfernung markierter entschützbarer Abbruchnukleotide;
- 30 4 die Inkubation mit einer Typ IIS-Restriktionsendonuklease, deren Erkennungsstelle im Linker vorhanden ist, gefolgt von der Dephosphorylierung der betreffenden tertiären Nukleinsäuren und von der *blunt end*-Ligation eines neuen Linkers an die tertiären Nukleinsäuren und der erneuten Inkorporation, Identifikation und Schutzgruppenentfernung eines markierten entschützbaren Abbruchnukleotids;
- 35 5 die mehrfache Wiederholung von Inkorporation, Identifikation und Schutzgruppenentfernung markierter entschützbarer Abbruchnukleotide; wobei *strand displacement* stattfindet;

- 6 die vollständige Entfernung des ursprünglichen Gegenstrangs des zu sequenzierenden Strangs durch *strand displacement* unter Wiederherstellung eines unverzweigten Doppelstrangs;
- 7 die Wiederholung der Schritte 4 bis 6 zeigt.

5

Fig. 12 zeigt eine weitere alternative Sequenzierung Oberflächen-gebundener Amplifikationsprodukte mittels fluoreszenzcodierter Linker mit überhängendem Ende und Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS, wobei im einzelnen

- 10 1 die sequenzspezifische Ligation eines Linkermoleküls an einen Fragmentüberhang, wobei eine Kombination aller möglichen Linkerüberhänge (beispielsweise 16 bei zweibasigem Überhang) zur Verfügung gestellt wird und die Sequenz des Überhangs einer jeden Linkerspezies eindeutig über ihre Markierungsgruppe oder ihre Kombination von Markierungsgruppen (*1,
- 15 *2) codiert wird;
- 2 die Identifikation der ligierten Linkerspezies anhand ihrer Markierungsgruppe oder Markierungsgruppen;
- 3 die Inkubation mit einer Typ IIS-Restriktionsendonuklease, deren Erkennungsstelle im Linker vorhanden ist;
- 20 4 die Wiederholung der Schritte 1 bis 3 zeigt.

Fig. 13 zeigt eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei

- 1 einen Laser;
- 25 2 einen Spiegel;
- 3 eine temperierbare Reaktionskammer auf XY-Tisch;
- 4 einen halbdurchlässigen Spiegel;
- 5 einen Detektor zeigt.

30 Die Erfindung wird im folgenden durch die Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1:

Vorbereitung von Nukleinsäuremolekülen

4 µg Gesamt-RNA aus Rattenleber wurde mit Ethanol gefällt und in 15,5 µl Wasser gelöst.
 35 Es wurden 0,5 µl 10 µM cDNA-Primer CP28V (5'-ACCTACGTGCAGATTTTTTTTTTTTTTTT-3') hinzugegeben. 5 Minuten bei 65°C denaturiert und auf Eis gestellt. Die Mischung wurde mit 3 µl 100 mM Dithiothreitol (Life Technologies GmbH, Karlsruhe), 6 µl 5× Superscript-Puffer (Life Technologies GmbH, Karlsruhe), 1,5 µl 10 mM dNTPs, 0,6 µl RNase Inhibitor (40 U/µl; Roche Molecular Bio-

chemicals) und 1 µl Superscript II (200 U/µl, Life Technologies) versetzt und zur cDNA-Erststrangsynthese 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Zur Zweitstrangsynthese wurden 48 µl Zweitstrang-Puffer (vgl. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1999), John Wiley & Sons), 3,6 µl 10 mM dNTPs, 148,8 µl H₂O, 1,2 µl RNaseH (1,5 U/µl, Promega) und 6 µl DNA Polymerase I (New England Biolabs GmbH Schwalbach, 10 U/µl) hinzugefügt und die Reaktionen 2 Stunden bei 22°C inkubiert. Es wurde mit 100 µl Phenol, dann mit 100 µl Chloroform extrahiert und mit 0,1 Vol. Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 15.000 g und Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet in einem Restriktionsansatz aus 15 µl 10× Universal buffer, 1 µl *Mbo*I und 84 µl H₂O gelöst und die Reaktion 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde mit Phenol, dann mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in einem Ligationsansatz aus 0,6 µl 10× Ligationspuffer (Roche Molecular Biochemicals), 1 µl 10 mM ATP (Roche Molecular Biochemicals), 1 µl Linker ML2025 (hergestellt durch Hybridisierung von Oligonukleotiden ML20 (5'-TCACATGCTAAGTCTCGCGA-3') und LM25 (5'-GATCTCGCGAGACTTAGCATGTGAC-3'), ARK), 6,9 µl H₂O und 0,5 µl T4 DNA Ligase (Roche Molecular Biochemicals) gelöst und die Ligation über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die Ligationsreaktion wurde mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt, mit Phenol, dann mit Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 1 µl Glycogen (20 mg/ml, Roche Molecular Biochemicals) mit 50 µl 28% Polyethylenglycol 8000 (Promega)/10 mM MgCl₂ gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 100 µl Wasser aufgenommen.

Beispiel 2:

Beschichtung mit Oligonukleotiden

Lyophilisierte, an ihrem 5'-Ende Aminolink-Gruppen tragende Oligonukleotide Amino-M13rev (5'-Amino-CAGGAAACAGCGATGAC-3') und Amino-T7 (5'-Amino-TAATACGACTCACTATAGG-3') (ARK Scientific GmbH, Darmstadt) wurden zu einer Endkonzentration von 1 mM in 100 mM Natriumcarbonatpuffer pH 9 aufgenommen. Mikroskopie-Objekträger aus Glas („Slides“; neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg) wurden 1 Stunde in Chromschwefelsäure gereinigt und danach 4× mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Lufttrocknung wurden die Slides 5 Minuten in einer 1%igen Lösung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan („Fluka“; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) in 95% Aceton/5% Wasser behandelt. Danach wurde zehnmal für je 5 Minuten in Aceton gewaschen und 1 Stunde auf 110°C erhitzt. Dann wurden die Slides für 2 Stunden in 0,2% 1,4-Phenylendiisothiocyanat („Fluka“; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) in einer Lösung aus 10% Pyridin in trockenem Dimethylformamid (Merck KGaA, Darmstadt) eingelegt. Nach 5 Waschschritten in Methanol und 3 Waschschritten in Aceton wurden die Slides luftgetrocknet und direkt zur Beschichtung weiterverarbeitet. Selbstklebende „Frame Seal“-Rähmchen für 65µl-Reaktionskammern (MJ Research Inc., Water-

town, Minnesota, USA) wurden aufgebracht, 65 µl Oligonukleotid-Lösung wurden in die so gebildeten Reaktionskammern pipettiert, und die Kammern wurden durch Aufkleben eines Polyester-Deckblatts (MJ Research Inc.) unter Ausschluß von Luftblasen versiegelt. Die genaue Position der Reaktionskammer wurde mit einem wasserfesten Filzschreiber auf der Unterseite der Slides gekennzeichnet. Die Bindung der Oligonukleotide via Aminolink an die Oberfläche der aktivierten Slides fand über 4 Stunden bei 37°C statt. Anschließend wurden die Kleberahmen entfernt und die Slides mit deionisiertem Wasser abgespült. Um verbliebene reaktive Gruppen zu inaktivieren, wurden die Slides für 15 Minuten in auf 50°C temperierter Blockierungslösung (50 mM Ethanolamin („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1 M Tris pH 9 („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1% SDS („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) behandelt. Zur Entfernung nicht-kovalent gebundener Oligonukleotide wurden die Slides 5 Minuten in 800 ml 0,1× SSC/0,1% SDS (vgl. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1999), John Wiley & Sons) gekocht. Die Slides wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Beispiel 3:

Beschichtung mit Oligonukleotiden

Lyophilisierte, an ihrem 5'-Ende Aminolink-Gruppen tragende Oligonukleotide Amino-M13rev (5'-Amino-CAGGAAACAGCGATGAC-3') und Amino-T7 (5'-Amino-TAATACGACTCACTATAGG-3') (ARK Scientific GmbH, Darmstadt) wurden zu einer Endkonzentration von 100 pmol/µl in deionisiertem Wasser aufgenommen. Je 1,4 µl dieser Primerlösungen wurden mit 32,2 µl Wasser und 35 µl 2× Bindepuffer (300 mM Natriumphosphat pH 8,5) vermischt. Selbstklebende „Frame Seal“-Rähmchen für 65µl-Reaktionskammern (MJ Research Inc., Watertown, Minnesota, USA) wurden auf „3D-Link activated slides“ (zur Bindung Amino-modifizierter Nukleinsäuren aktivierte Objektträger aus Glas; (Surmodics, Eden, Prairie, Minnesota, USA) aufgebracht. 65 µl Oligonukleotid-Lösung wurden in die so gebildeten Reaktionskammern pipettiert, und die Kammern wurden durch Aufkleben eines Polyester-Deckblatts (MJ Research Inc., Watertown, Minnesota, USA) unter Ausschluß von Luftblasen versiegelt. Die genaue Position der Reaktionskammer wurde mit einem wasserfesten Filzschreiber auf der Unterseite der Slides gekennzeichnet. Die Bindung der Oligonukleotide via Aminolink an die Oberfläche der aktivierten Slides fand über Nacht bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurden die Kleberahmen entfernt und die Slides mit deionisiertem Wasser abgespült. Um verbliebene reaktive Gruppen zu inaktivieren, wurden die Slides für 15 Minuten in auf 50°C temperierter Blockierungslösung (50 mM Ethanolamin („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1 M Tris pH 9 („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 0,1% SDS („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze) behandelt. Zur Entfernung nicht-kovalent gebundener Oligonukleotide wurden die Slides 5 Minuten in 800 ml 0,1× SSC/0,1% SDS

(vgl. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1999), John Wiley & Sons) gekocht. Die Slides wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Beispiel 4:

- 5 Plasmide pRNODCAB (enthält Basen 982 bis 1491 des Transkripts von Ornithindecaboxylase aus Ratte, AC-Nummer J04791, kloniert in Vektor pCR II (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) und pRNHPRT (enthält Basen 238 bis 720 des Transkripts Hypoxanthinphosphoribosyltransferase aus Ratte, AC-Nummer M63983, kloniert in Vektor pCR II (Invitrogen)) wurden linearisiert, indem je 1 µg Plasmid in einem Volumen von 20 µl 1×
- 10 Restriktionspuffer H („Roche Molecular Biochemicals“: Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit je 5 U der Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Sca*I (Roche Molecular Biochemicals) für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde eine Amplifikation der Vektor-Inserts vorgenommen, indem je 1 µl der Restriktionsansätze in einem Volumen von 100 µl PCR-Puffer II (Perkin-Elmer, Foster City, California, USA) mit 4 µl 10 mM
- 15 Primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'), 4 µl 10 mM Primer M13 (5'-CAGGAAACAGCGATGAC-3') (ARK), 4 µl 50 mM MgCl₂ („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 5 µl Dimethylsulfoxid („Fluka“: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze), 1 µl 10 mM dNTPs (Roche Molecular Biochemicals), und 1 µl AmpliTaq DNA Polymerase (5u/µl; Perkin-Elmer) versetzt wurde. Anschließend wurden die Reaktionen in
- 20 einem Gene Amp 9700 Thermocycler (Perkin-Elmer) einem Temperaturprogramm bestehend aus 20 Zyklen Denaturierung für 20 Sekunden bei 95°C, Primerannealing für 20 Sekunden bei 55°C und Primerextension für 2 Minuten bei 72°C unterworfen. Die Amplifikationsprodukte wurden elektrophoretisch auf einem 1,5% Agarosegel auf ihre richtige Größe hin untersucht. Zur Entfernung uninkorporierter Primer wurden die Reaktionen
- 25 mittels QiaQuick-Säulen (Qiagen AG, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt und in 50 µl deionisierten Wassers eluiert.

Beispiel 5:**Amplifikation**

- 30 Zur Befestigung von in Beispiel 2 vorbereiteten Nukleinsäuren an Glasträgern wurden Annealing-Mischungen aus je 1 µl unverdünnter oder in parallelen Ansätzen 1:10, 1:100 bzw. 1:1000 mit Wasser verdünnter Amplifikationsprodukt-Lösungen, je 4 µl 50 mM MgCl₂-Lösung, je 1 µl Rinderserumalbumin (20 mg/ml; Roche Molecular Biochemicals), je 5 µl Dimethylsulfoxid, je 1 µl 10 mM dNTPs und je 1 µl AmpliTaq in einem Gesamtvolumen
- 35 von je 100 µl 1× PCR-Puffer II hergestellt. Unter Beachtung der Filzschreiber-Markierungen auf der Slide-Unterseite wurden Frame-Seal-Kammern in den zur Oligonukleotid-Beschichtung verwendeten Positionen auf die in Beispiel 1 vorbereiteten Slides aufgebracht. Dann wurden je 65 µl der Annealing-Mischungen in die Reaktionskammern pipettiert und die Kammern wie oben versiegelt. Die Slides wurden auf den Heizblock ei-

nes UNO II-in situ-Thermocyclers (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) gelegt, mit einem Polster aus Papiertüchern abgedeckt und mittels des höhenverstellbaren Heizdeckels an den Heizblock gepreßt. Zum Annealing und der nachfolgenden Primerextension kam folgendes Temperaturprogramm zur Anwendung: Denaturierung 30 Sekunden bei 94°C, Annealing 10 Minuten bei 55°C, Primerextension 1 Minute bei 72°C. Nach erfolgter Reaktion wurden die Reaktionskammern entfernt und die Slides wurden mit deionisiertem Wasser abgespült. Zur Entfernung der nicht-kovalent gebundenen Stränge wurde 1 Minute in 800 ml 0,1× SSC/0,1% SDS gekocht, die Slides mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Um eine kompartmentierte Amplifikation der an den Träger gebundenen Nukleinsäuremoleküle vorzunehmen, wurden erneut an den zuvor gewählten Positionen Reaktionskammern aufgebracht und 65 µl einer Amplifikationsmischung aufgetragen, zusammengesetzt wie folgt: 4 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl Rinderserumalbumin (20 mg/ml), 5 µl Dimethylsulfoxid, 1 µl AmpliTaq (5 U/µl), 1 µl 10 mM dNTPs, in 100 µl 1× PCR-Puffer II. Nach Versiegelung der Kammern wurde auf dem in situ-Thermocycler folgendes Temperaturprogramm angewendet: Denaturierung 20 Sekunden bei 93°C, Primerannealing 20 Sekunden bei 55°C, Extension 1 Minute bei 72°C, für 50 Zyklen. Nach beendeter Amplifikation wurden die Kammern entfernt und die Slides mit Wasser abgespült und luftgetrocknet. Zur Detektion der durch kompartmentierte Amplifikation entstandenen klonalen Inseln wurden 40 µl SYBR Green I-Lösung (Molecular Probes; Lösung 1:10.000 in Wasser) auf die Slides pipettiert und mit Deckgläsern #2 (MJ) abgedeckt. Die Detektion erfolgte auf einem konfokalen Mikroskop DMRBE (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Heidelberg) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Detektionswellenlänge von 530 nm. Es konnten klonale Inseln kompartmentiert amplifizierter Nukleinsäuremoleküle detektiert werden, die sich in einer Zufallsanordnung über die Slideoberfläche im Bereich der Reaktionskammern verteilten (vergl. Abb. 8). Im Bereich von Reaktionskammern, in denen als Negativkontrolle entweder keine Oligonukleotide an den Träger gebunden worden waren oder in denen die Amplifikationsreaktion ohne vorherige Hybridisierung von Matritzen-Molekülen vorgenommen worden war, wurden hingegen keine von klonalen Inseln stammende Signale detektiert. Weiterhin zeigte der Vergleich der Slide-Oberflächen im Bereich von Reaktionskammern, in denen unterschiedliche Konzentrationen von Matritzen eingesetzt worden war, eine näherungsweise lineare Abhängigkeit der Anzahl gebildeter klonaler Inseln von der Menge an eingesetzten Molekülen.

Beispiel 6:

Zur Identifikation der Nukleinsäuremoleküle in den detektierten klonalen Inseln wurden die Slides nach der Detektion der mittels SYBR Green angefärbten doppelsträngigen DNA 10 Minuten in Wasser entfärbt. Dann wurden erneut Reaktionskammern an den gleichen Positionen wie zuvor aufgeklebt und eine Restriktionsmischung, bestehend aus 12 µl 10× Universal buffer (Stratagene GmbH, Heidelberg), 1 µl Rinderserumalbumin, 3 µl Restrik-

tionsendonuklease *MboI* (1 U/ μ l; Stratagene) und 64 μ l Wasser, hinzupipettiert. Zur Restriktion der Nukleinsäuremoleküle mittels der internen *MboI*-Schnittstelle wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert, dann wurden die Reaktionskammern entfernt und die Slides mit Wasser gewaschen. Die nicht kovalent an den Glasträger gebundenen Strangfragmente wurden
5 durch Denaturierung für 2 Minuten in 800 ml kochendem 0,1× SSC/0,1% SDS entfernt. Nach erneutem Waschen in Wasser und Lufttrocknung wurden neue Reaktionskammern aufgebracht. Pro Hybridisierungsexperiment wurde eine Hybridisierungslösung aus 8 μ l 10× PCR-Puffer II, 3,2 μ l 50 mM MgCl₂, 2 μ l 100 pmol/ μ l Oligonukleotidsonde Cy5-HPRT (5'-Cy5-TCTACAGTCATAGGAATGGACCTATCACTA-3'; ARK), 2 μ l 100
10 pmol/ μ l Oligonukleotidsonde Cy3-ODC (5'-Cy3-ACATGTTGGTCCCCAGATGCTGGA-TGAGTA-3') und 65 μ l Wasser hergestellt. Für jedes Hybridisierungsexperiment wurden 65 μ l hiervon in die jeweilige Reaktionskammer gegeben und 3 Stunden bei 50°C hybridisiert. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Reaktionskammern entfernt und die Slides 5 Minuten bei Raumtemperatur in 30 ml 0,1× SSC/0,1% SDS gewaschen. Die Slides
15 wurden kurz mit destilliertem Wasser abgespült, luftgetrocknet und zur Detektion eingesetzt. Die Detektion erfolgte wie oben mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops. Als Anregungswellenlängen wurden 568 nm und 647 nm verwendet, nachgewiesen wurden Signale bei 600 nm und bei 665 nm. Es konnte gezeigt werden, daß die zuvor mit SYBR Green detektierten klonalen Inseln zum Teil durch die Sonde Cy3-ODC und zum Teil
20 durch die Sonde Cy5-HPRT detektiert wurden.

Beispiel 7:

Expressionsanalyse durch hochparallele Sequenzierung von Nukleinsäure-molekülen
25 Die in Beispiel 1 erhaltenen Ligationsprodukte wurden 1:1000 mit Wasser verdünnt und 1 μ l dieser Verdünnung wie in Beispiel 5 beschrieben für 50 Zyklen kompartimentiert amplifiziert. Hierfür wurden wie beschrieben mit den Amplifikationsprimern Amino-CP28V (5'-Amino-ACCTACGTGCAGATTTTTTTTTTTTTTTTV-3') und Amino-ML20 (5'-Amino-TCACATGCTAAGTCTCGCGA-3') beschichtete Glasslides verwendet. Zur einseitigen
30 Ablösung der Amplifikationsprodukte vom Träger wurde die Amplifikationsmischung durch eine Restriktionsmischung ersetzt, bestehend aus 12 μ l 10× Universal buffer (Stratagene), 1 μ l Rinderserumalbumin, 4 μ l Restriktionsendonuklease *MboI*, in einem Endvolumen von 65 μ l. Nach Inkubation bei 37°C für 2 h wurde die Restriktionsmischung ersetzt durch eine Dephosphorylierungsmischung aus 1 U alkalischer Phosphatase aus arktischen
35 Krabben (Amersham) in 65 μ l des mitgelieferten Reaktionspuffers. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und Inaktivierung für 15 Minuten bei 65°C wurden Reaktionskammern und die Dephosphorylierungsmischung entfernt, die Slides gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, erneut Reaktionskammern aufgebracht und mit 65 μ l einer Ligationsmischung gefüllt, bestehend aus 3 U T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics) und 500 ng am

5'-Ende phosphoryliertem Hairpin-Sequenzierprimer SLP33 (5'-TCTTCGAATGCACTG-AGCGCATTCGAAGAGATC-3') in 65 µl des mitgelieferten Ligationspuffers. Es wurde 14 Stunden bei 16°C ligiert, dann wurden Ligationsmischung und Reaktionskammern entfernt. Zur Entfernung der nicht kovalent an den Glasträger gebundenen Strangfragmente wurde für 2 Minuten in 800 ml kochendem 0,1× SSC/0,1% SDS behandelt und mit destil-

5 liertem Wasser nachgewaschen. Zur Herstellung geeigneter entschützbarer Abbruch-nukleotide wurden dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Roche Molecular Biochemicals) an ihrer 3'-OH-Gruppe mit 4-Aminobuttersäure verestert. Diese Derivate wurden mit den Fluoreszenzgruppen FAM (dATP, dCTP) und ROX (dGTP, dTTP) markiert (Molecular

10 Probes Inc., Eugene, Oregon, USA). Zur parallelen Bestimmung der ersten Base wurden erneut Reaktionskammern auf die Slides aufgebracht und eine Primerextensionsmischung aus 1 mM FAM-dATP, 1 mM ROX-dGTP und 2 U Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA) in 65µl Reaktionspuffer (40 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, und 25 mM NaCl) eingefüllt. Nach Inkubation bei 37°C für 5 Minuten wurde mit

15 Reaktionspuffer gewaschen und auf dem Laserscanningmikroskop detektiert. Anregungs-wellenlängen waren 488 nm und 568 nm, detektiert wurde bei 530 nm und bei 600 nm. Nach der Detektion wurde erneut Primerextensionsmischung zugegeben, welche nun die übrigen beiden markierten Nukleotide, FAM-dCTP und ROX-dTTP, enthielt. Nach erfolgter Inkorporation wurde erneut gewaschen und detektiert, und die Schutzgruppen wur-

20 den durch enzymatische Spaltung entfernt. Hierzu wurde mit 5 mg/ml Chirazyme L Lipase (Roche Diagnostics) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 9 für 1 h bei 35°C behandelt. Anschließend wurde die Sequenzierung wie oben beschrieben für 15 weitere Zyklen durchgeführt.

25

Beispiel 8:

Beschichtung von Polyacrylamid-Trägern mit Oligonukleotiden

30 Objektträger für die Mikroskopie (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) wurden mit Ethanol gereinigt und mit Bindesilan (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg; 50 µl Silan und 50 µl Essigsäure in 10 ml Ethanol) behandelt. Nach Entfernung überschüssigen Silans mittels Ethanol und Wischtüchern wurde eine Acrylamid-Polymerisationsmischung hergestellt, bestehend aus 10 µl 50% „Long ranger“ Acrylamidlösung (Biozym Diagnostik

35 GmbH, Hessisch Oldendorf), je 20 µl 200 µM Acrydite-modifizierten Primern Acryl-T₁₅-T7 (5'-Acrydite-TTT TTT TTT TTT TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3'; Eurogentec, Seraing/Belgien) und Acryl-TA₁₅-M13 (5'-Acrydite- TTA TTA TTA TTA TTA CAG GAA ACA GCG ATG AC-3'; Eurogentec), 0,5 µl 10% Ammoniumpersulfat (Fluka) und 0,5 µl 10% TEMED (Fluka). Je 5 µl dieser Mischung wurden auf einen Objektträger gege-

ben und zur Polymerisation mit einem Deckglas (Merck) abgedeckt. Nach erfolgter Polymerisation wurden die Deckgläser entfernt und Frame Seal-Reaktionskammern aufgebracht.

5

Beispiel 9:

Beschichtung von Polystyrol-Trägern mit Oligonukleotiden

- 10 Es wurde eine Primerbindungslösung hergestellt, bestehend aus 19 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), 100 µl 1 M 1-Methylimidazol (Sigma-Aldrich), je 20 µl 100 µM aminomodifizierter Primer Amino-T₁₅-T7 (5'-Amino-TTT TTT TTT TTT TTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3'; ARK) und Amino-TA₁₅-M13 (5'-Amino- TTA TTA TTA TTA TTA CAG GAA ACA GCG
15 ATG AC-3'; ARK). Je 100 µl dieser Lösung wurden in NucleoLink-Gefäße (Nunc GmbH & CO.KG, Wiesbaden) gegeben und über Nacht bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Primerbindungslösung entfernt und die NucleoLink-Gefäße wurden nach Herstellerangaben gewaschen.

20

Beispiel 10:

Expressionsanalyse durch hochparallele Sequenzierung von Nukleinsäure-molekülen

- 25 Nukleinsäuremoleküle wurden analog zu Beispiel 1 vorbereitet, allerdings wurde als Linker BL2123 (hergestellt durch Hybridisierung der Oligonukleotide BL23 [5'-GCTCAGATCGCAGCTTAGCGAT-3'] und LB 21 [5'-ATCGCTAAGCTGCGATCTGA-3'] in Ligasepuffer) statt ML2025 verwendet. Nach Beschichtung von Objektträgern mit Amplifikationsprimern Acryl-TA₁₅-CP28V (5'-
30 Acrydite-TTA TTA TTA TTA TTA ACC TAC GTG CAG ATT TTT TTT TTT TTT TV-3'; Eurogentec) und Acryl-T₁₅-BL23 (5'-Acrydite-TTT TTT TTT TTT TTT GCT CAG ATC GCA GCT TAG CGA T-3') wie in Beispiel 8 beschrieben wurde wie in Beispiel 5 nach Hybridisierung der Nukleinsäuremoleküle an die oberflächengebundenen Oligonukleotide, Primerextension und Entfernung der nicht-oberflächengebundenen Stränge für
35 50 Zyklen amplifiziert. Die so erhaltenen Amplifikationsprodukte wurden zur halbseitigen Ablösung der Amplifikationsprodukte vom Träger mit einer Restriktionsmischung bestehend aus 10 U Restriktionsendonuklease *BbvI* (New England Biolabs) und 1 µl Rinderse-
rumalbumin in 65 µl 1× NEBuffer 2 (New England Biolabs) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Frame Seal-Reaktionskammern wurden die Slides mit destilliertem

Wasser gewaschen und mit neuen Glas-Reaktionskammern versehen, welche ein Lumen von 150 µl aufwiesen und zwei verschließbare Öffnungen zum Lösungsaustausch hatten. Wie in Beispiel 7 beschrieben wurde die erste Base des erzeugten 5'-Überhangs durch Inkorporation fluoreszenzmarkierter entschützbarer Abbruchnukleotide bestimmt sowie anschließend die Schutzgruppe entfernt. Dies wurde drei weitere Male wiederholt, so daß der Überhang vollständig zu einem eine freie 3'-OH-Gruppe tragenden glatten Ende aufgefüllt wurde. Dann wurde nach gründlichem Spülen der Reaktionskammer mit destilliertem Wasser eine Ligationsmischung aufgetragen, bestehend aus 10 U T4 DNA-Ligase (Roche) und 3 µg des *Bbv*I-Linkers BL2123P, in 150 µl auf 1 mM Hexammincobalt(III)chlorid (Fluka), 0,3 mM ATP und 0,5 mM Spermidintrihydrochlorid (Sigma-Aldrich) supplementiertem Ligasepuffer. Der *Bbv*I-Linker BL2123P war zuvor hergestellt worden durch Hybridisierung der Oligonukleotide BL23 (5'-GCTCAGATCGCAGCTTAGCGAT-3'; ARK) und LB21P (5'-ATCGCTAAGCTGCGATCTGA-3'; 5'-phosphoryliert; ARK) in Ligasepuffer. Nach Ligation für 8 Stunden bei 16°C wurde erneut wie oben beschrieben mit *Bbv*I geschnitten, die Kammern gründlich gespült und die Überhänge sequenziert. Dieser Vorgang aus Sequenzierung, Linkerligation und erneuter Generation eines zum Fragmentinneren hin verlagerten Überhangs über *Bbv*I-Restriktion wurde drei weitere Male wiederholt, so daß eine Leseweite von insgesamt 20 Basen erreicht wurde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur parallelen Sequenzierung von mindestens zwei verschiedenen in einem
5 Nukleinsäuregemisch enthaltenen Nukleinsäuren, wobei
 - (a) eine Oberfläche bereitgestellt wird, aufweisend Inseln von Nukleinsäuren jeweils gleicher Sorte, tertiäre Nukleinsäuren;
 - (b) die tertiären Nukleinsäuren so behandelt werden, daß die Produkte nur mit dem
10 5'-Ende eines Stranges eines Doppelstranges mit der Oberfläche verbunden sind;
 - (c) die tertiären Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten werden;
 - (d) eine oder mehrere Basen der tertiären Nukleinsäuren bestimmt werden;
 - (e) Linkermoleküle durch Ligation mit den freien Enden der tertiären Nukleinsäuremoleküle verbunden werden, wobei die Linkermoleküle eine oder mehrere
15 Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS aufweisen;
 - (f) Die tertiären Nukleinsäuren erneut durch eine oder mehrere Restriktionsendonukleasen vom Typ IIS geschnitten werden, die Sequenzabschnitte erkennen, die in Schritt (e) durch die Linkermoleküle in die tertiären Nukleinsäuren eingeführt worden sind; und
20
 - (g) Schritte (d), (e) und (f) sooft wiederholt werden, bis die gewünschte Sequenzinformation erhalten worden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei im Schritt (a)
 - 25 (a1) eine Oberfläche bereitgestellt wird, an welche mindestens Primermoleküle eines ersten Primers und eines zweiten Primers und gegebenenfalls ein Nukleinsäuregemisch umfassend die Nukleinsäuremoleküle, mit welchen beide Primer hybridisieren können, irreversibel immobilisiert worden sind, wobei beide Primer ein Primerpaar bilden;
 - 30 (a2) Nukleinsäuremoleküle des Nukleinsäuregemischs mit einem oder mit beiden Primern desselben Primerpaares hybridisiert werden;
 - (a3) die irreversibel immobilisierten Primermoleküle komplementär zum Gegenstrang unter Bildung von sekundären Nukleinsäuren verlängert werden;
 - (a4) die Oberfläche in einer von Nukleinsäuremolekülen, die nicht durch irreversible Immobilisierung an die Oberfläche gebundenen sind, befreiten Form
35 bereitgestellt wird;
 - (a5) die sekundären Nukleinsäuren unter Bildung von tertiären Nukleinsäuren amplifiziert werden;

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei im Schritt (a1)
eine Oberfläche, an welche mindestens ein Primerpaar bildende Primermo-
leküle irreversibel immobilisiert wurden, bereitgestellt wird.
- 5 4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (b) und/oder
Schritt (c) durch Spaltung der tertiären Nukleinsäuren mit Hilfe einer Restriktions-
endonuklease verwirklicht werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltung einen 5'-
10 Überhang erzeugt.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltung einen 3'-
Überhang erzeugt.
- 15 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt
(a1) Primer oder Nukleinsäuremoleküle mit flankierenden Sequenzabschnitten ver-
wendet werden, von denen mindestens ein Primer eines Primerpaars mindestens eine
Restriktionsschnittstelle aufweist und eine dieser Restriktionsschnittstellen für die Re-
striktionsspaltung nach Anspruch 4 benutzt wird.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (d) durch die folgen-
de Schritte umfaßt:
(d1) Verlängerung des 3'-Endes des erzeugten 5'-Überhangs um ein Nukleotid,
wobei
25 - das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine
Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert (oder stark
verlangsamt),
- das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleo-
tids ermöglicht;
30 (d2) Identifikation des eingebauten Nukleotids;
(d3) Entfernung der Schutzgruppe und Entfernung oder Veränderung der zur Identi-
fikation verwendeten Molekülgruppe und
(d4) gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (d1) bis (d3).
- 35 9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Reihenfolge der
Schritte (d) und (e) vertauscht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Reihenfolge der Schritte
(d) und (e) vertauscht wird und Schritt (d) die folgende Schritte umfaßt:

- (d1) Verlängerung des 3'-Endes des mit dem 5'-Überhang verbundenen Linkers um ein Nukleotid, wobei
- das Nukleotid an der 2'-OH-Position oder an der 3'-OH-Position eine Schutzgruppe trägt, die eine weitere Verlängerung verhindert (oder stark verlangsamt),
 - 5 - das Nukleotid eine Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht;
- (d2) Identifikation des eingebauten Nukleotids und
- (d3) Entfernung der Schutzgruppe und Entfernung oder Veränderung der zur Identifikation verwendeten Molekülgruppe;
- 10 (d4) gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (d1) bis (d3).
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (a1) die Primermoleküle durch Ausbildung einer kovalenten Bindung an eine Oberfläche irreversibel immobilisiert werden.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d2) die Base die Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht.
- 20 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d2) die Schutzgruppe die Molekülgruppe trägt, die die Identifikation des Nukleotids ermöglicht.
- 25 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d1) das Nukleotid an der 3'-OH-Position die Schutzgruppe trägt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d1) das Nukleotid an der 2'-OH-Position die Schutzgruppe trägt.
- 30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d1) die Schutzgruppe eine spaltbare Silylether, Ester-, Ether-, Anhydrid- oder Peroxid-Gruppe oder eine Sauerstoff-Metall-Gruppe aufweist.
- 35 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d3) die Entfernung der Schutzgruppe durch ein komplexbildendes Ion, vorzugsweise durch Cyanid, Thiocyanat, Fluorid oder Ethylendiamintetraacetat erfolgt.
18. Verfahren einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d3) die Schutzgruppe photochemisch abgespalten wird.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (d1) die Schutzgruppe einen Fluorophor aufweist und in Schritt (d2) das Nukleotid fluorometrisch identifiziert wird.
- 5 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Schritte (d) und (e) durch die Ligation indentifizierbarer Linker an die tertiären Nukleinsäuren verwirklicht werden.

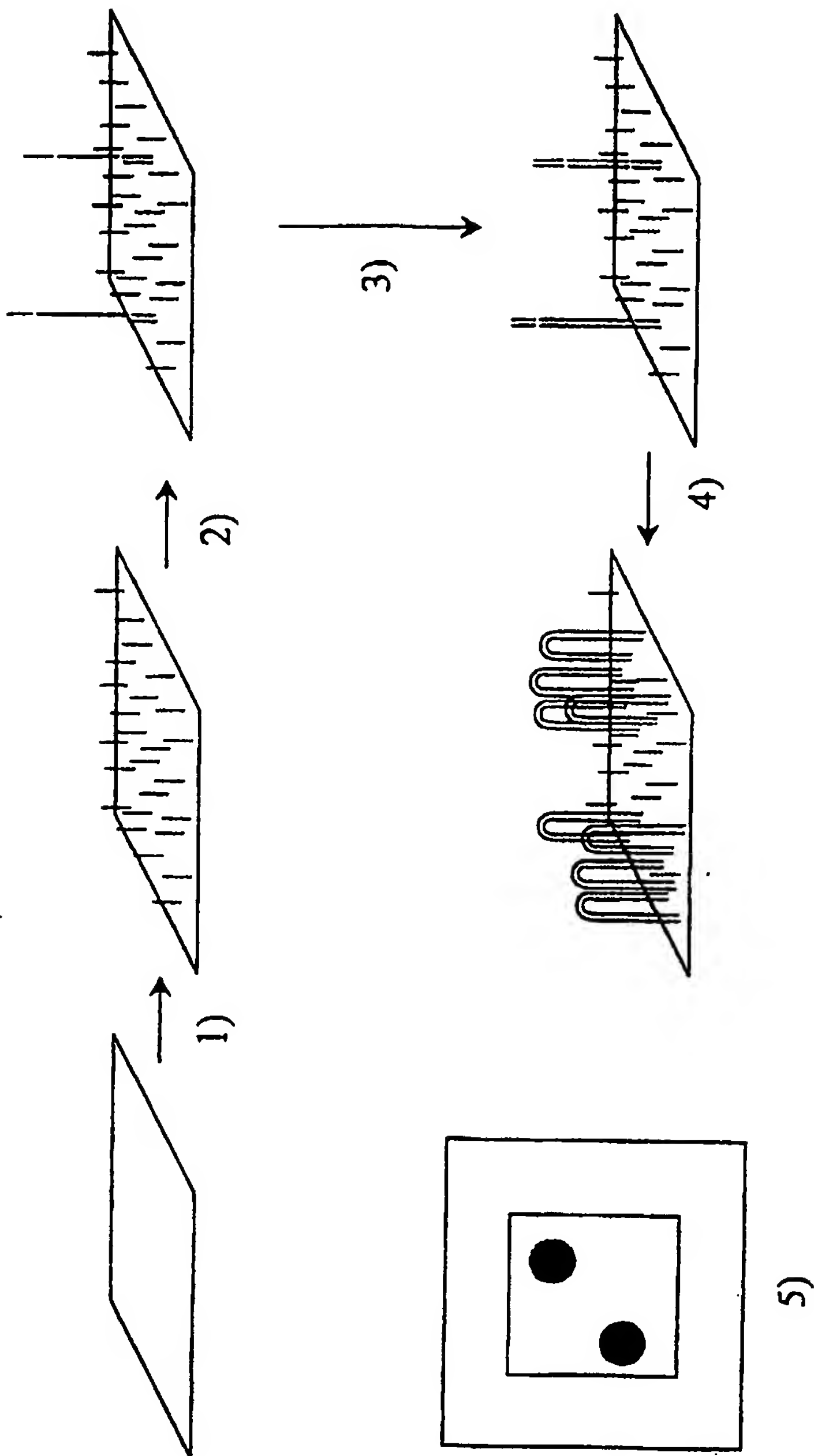


Fig. 1

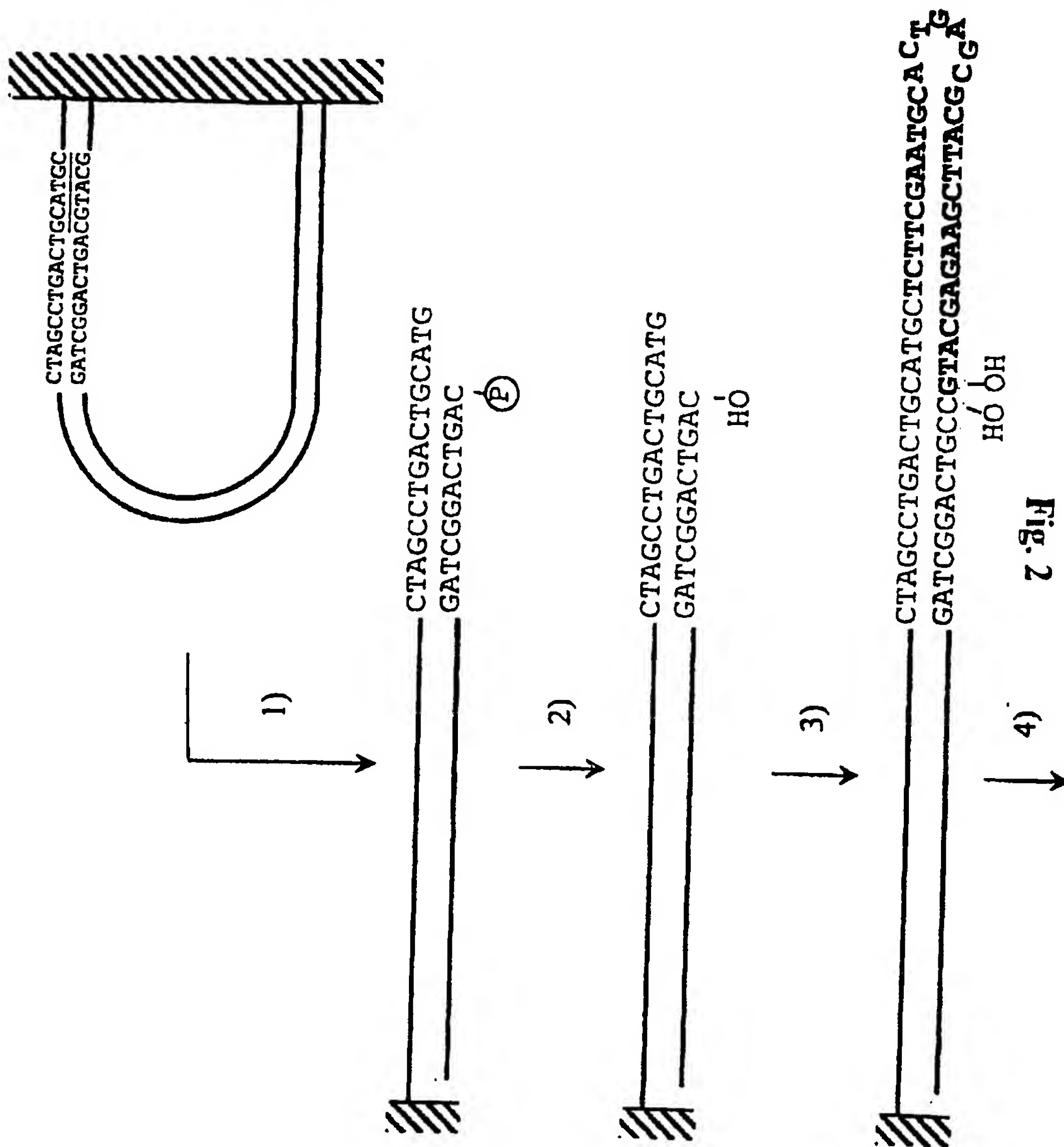


Fig. 2

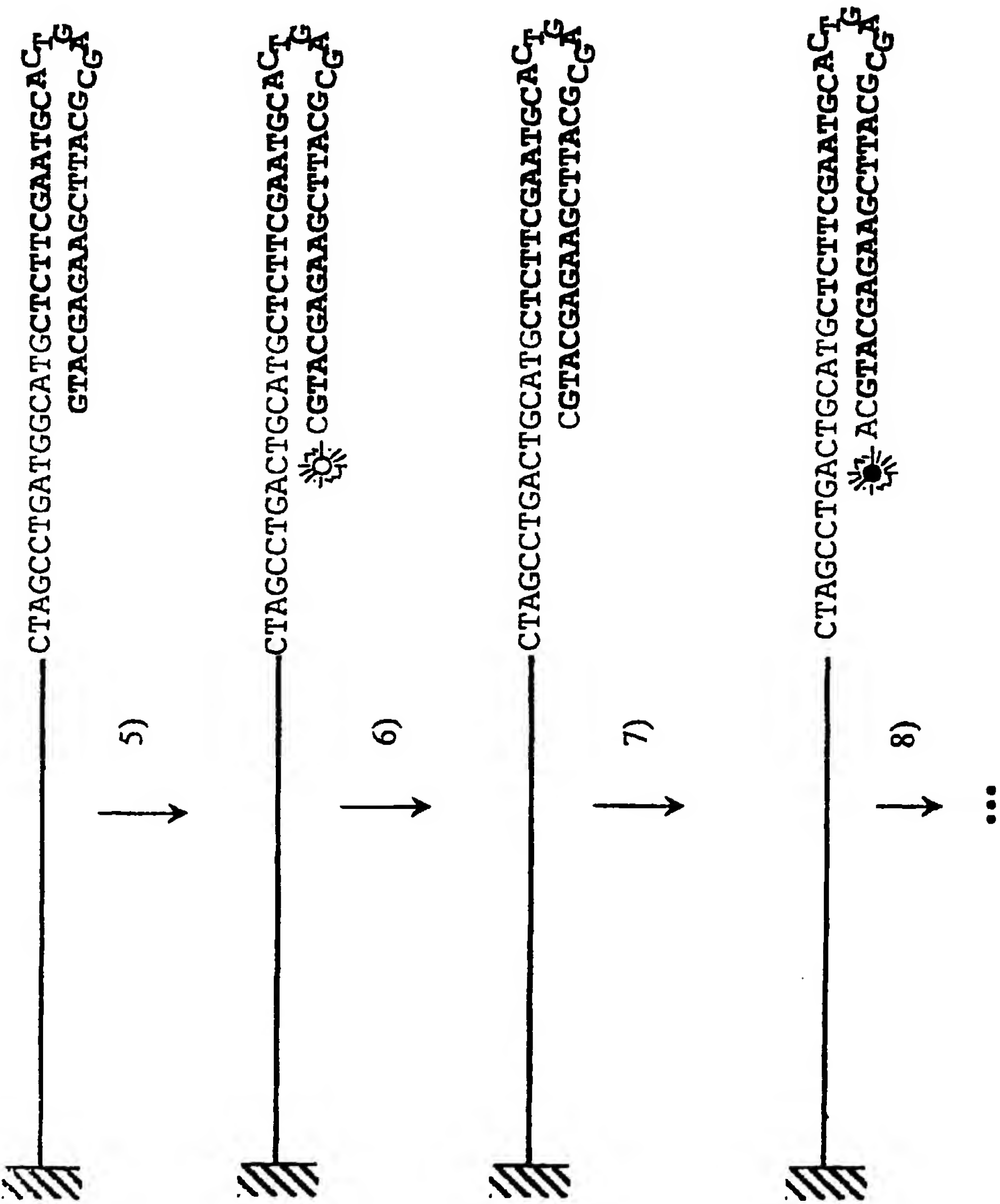


Fig. 2

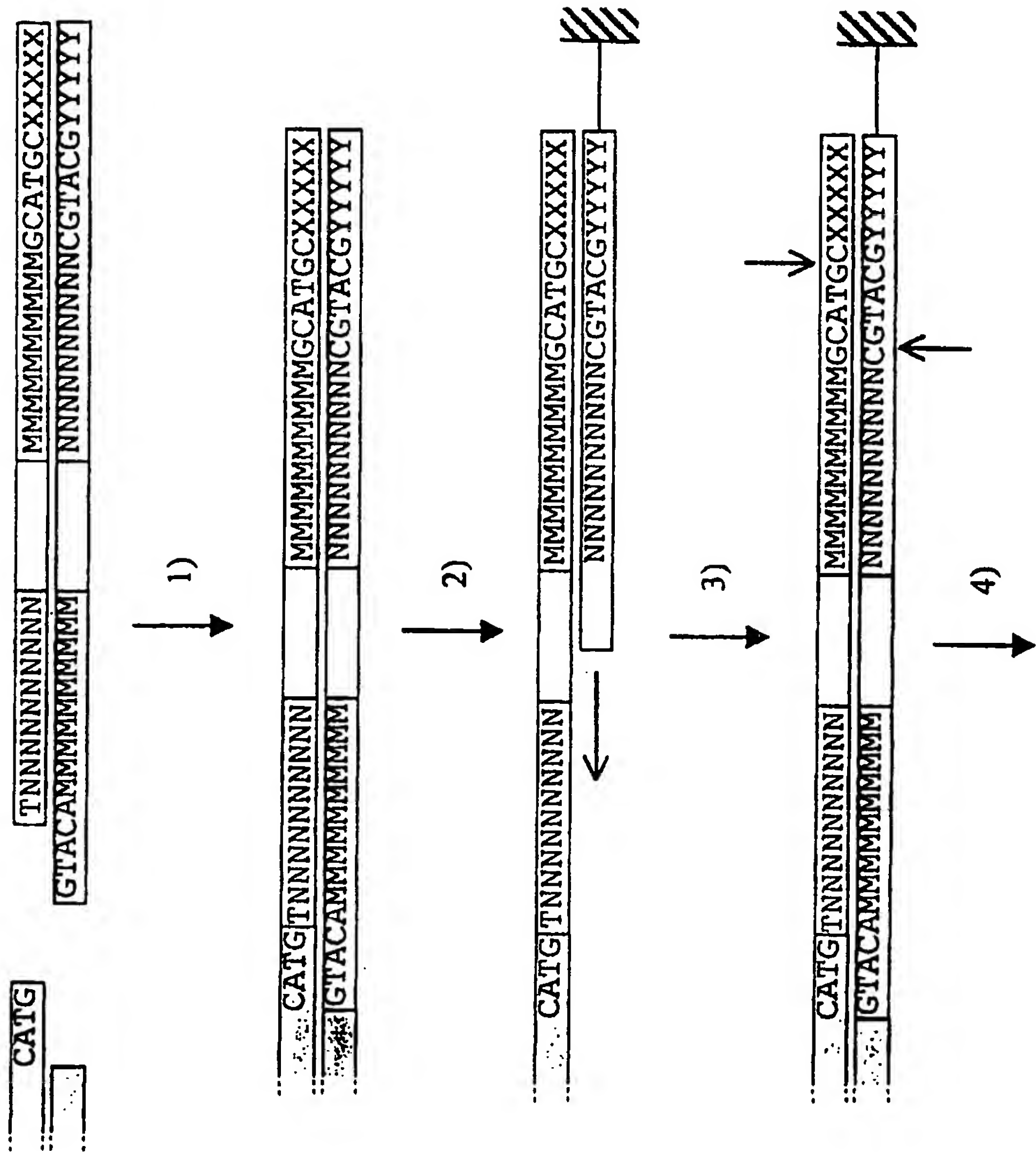


Fig. 3

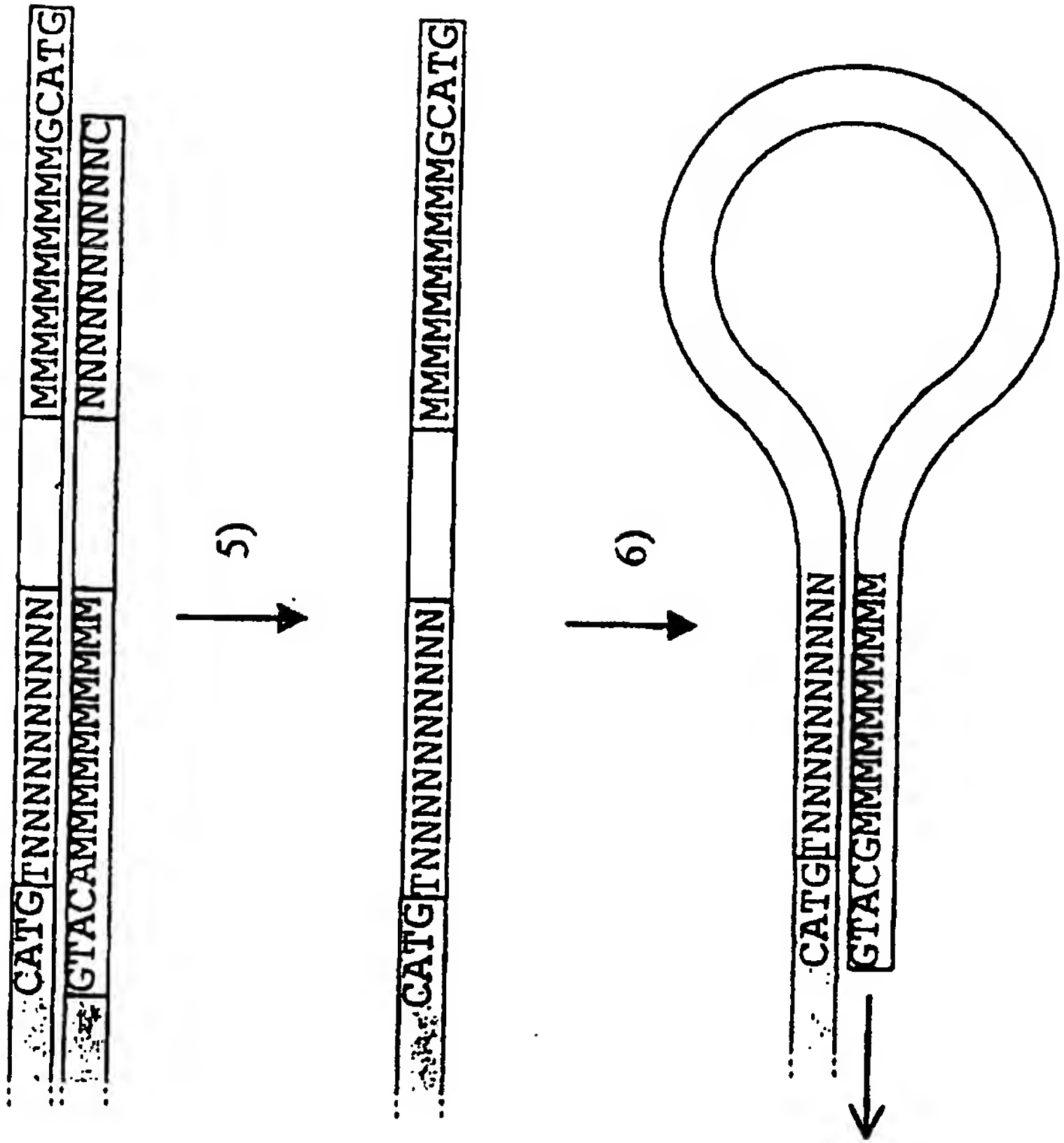


Fig. 3

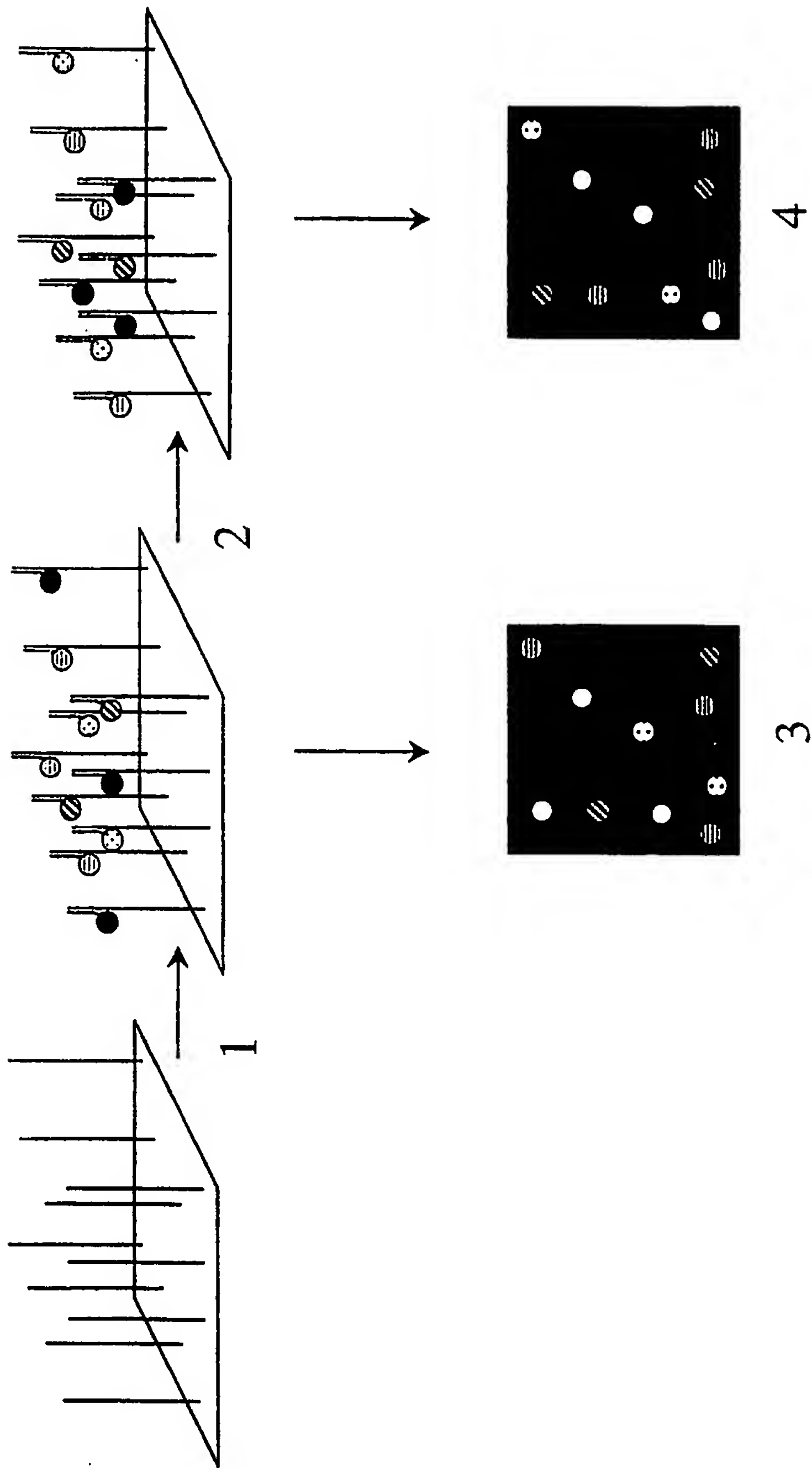


Fig. 4

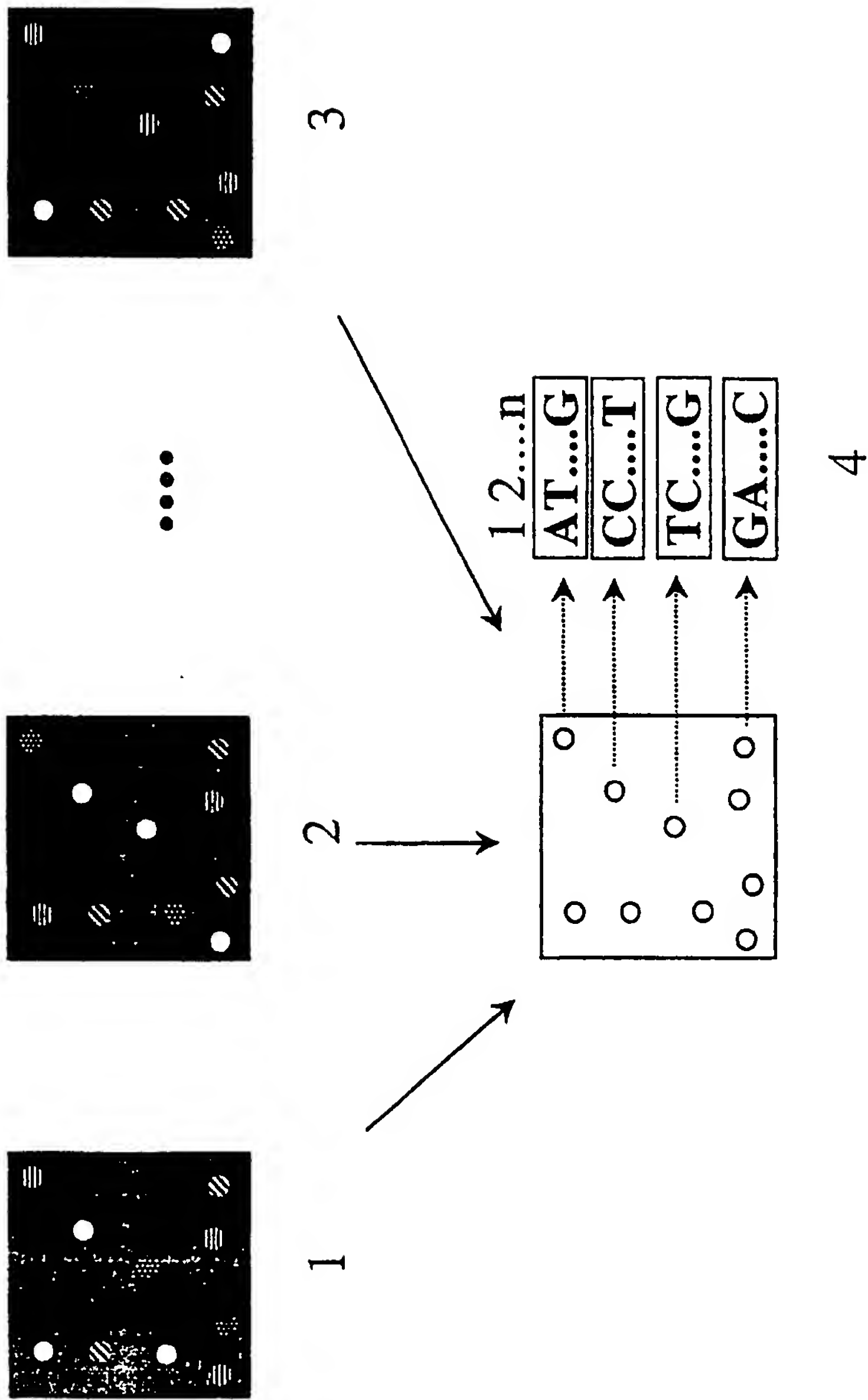


Fig. 5

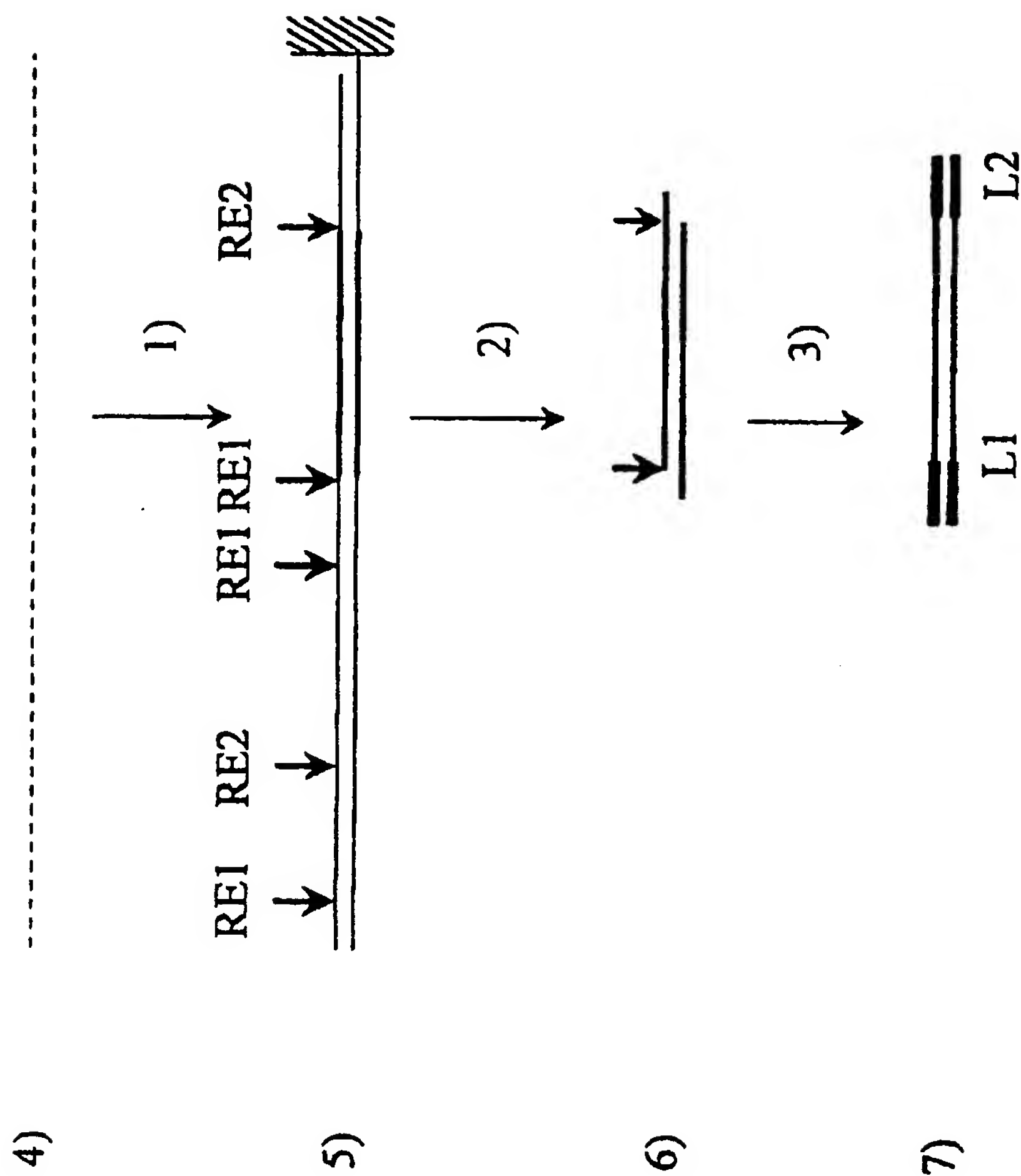


Fig. 6

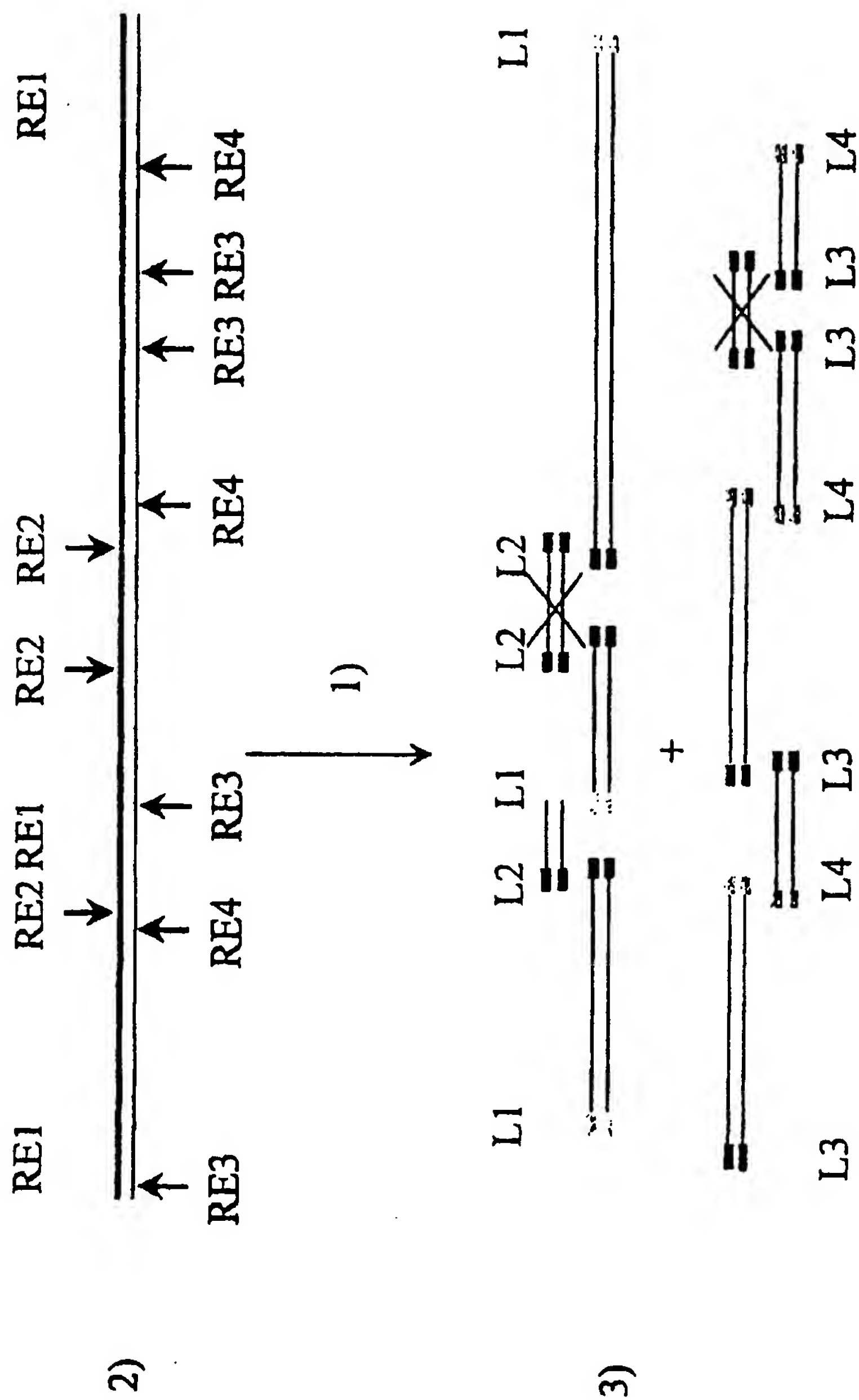


Fig. 7

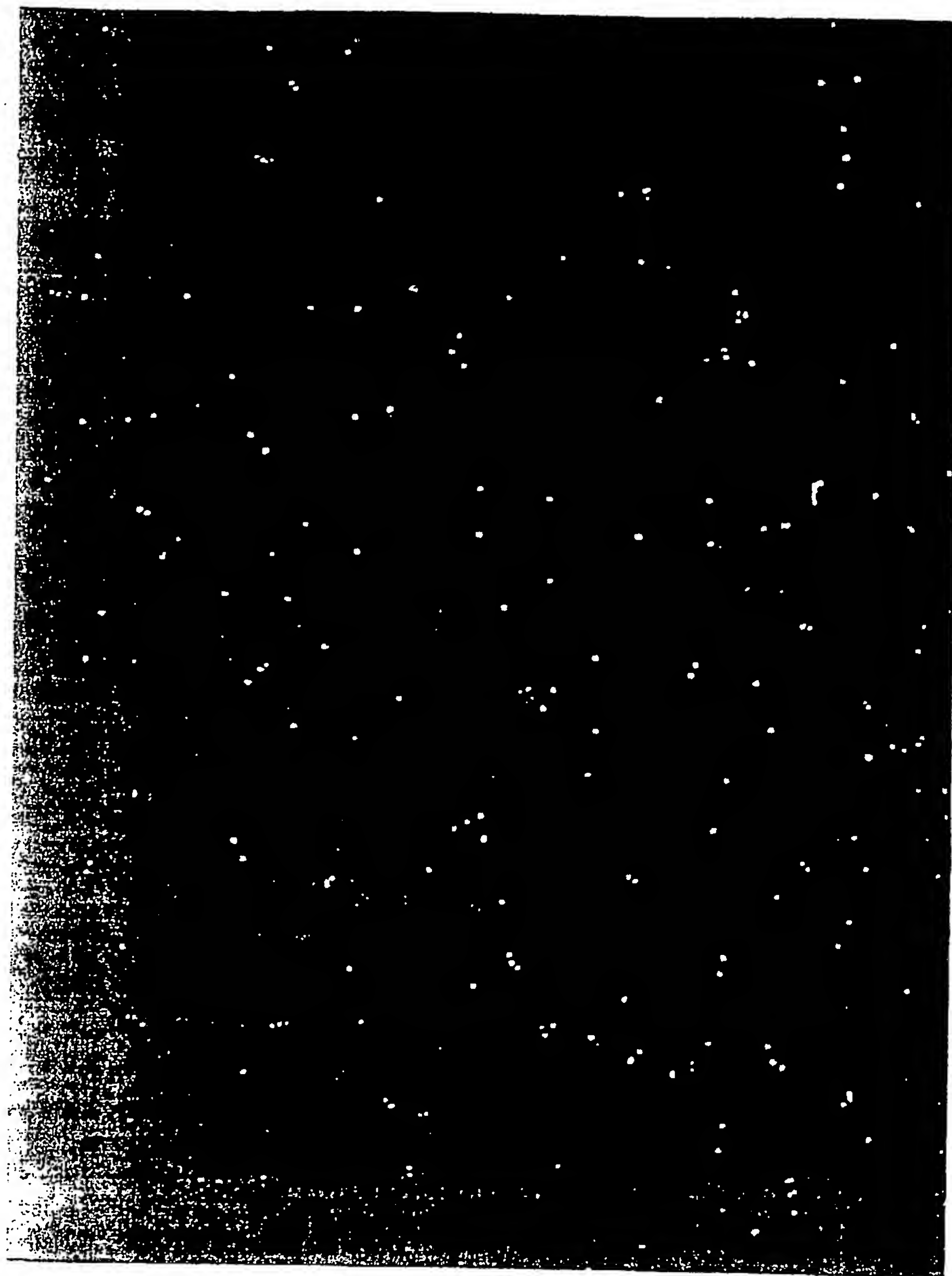


Fig. 8

11/15

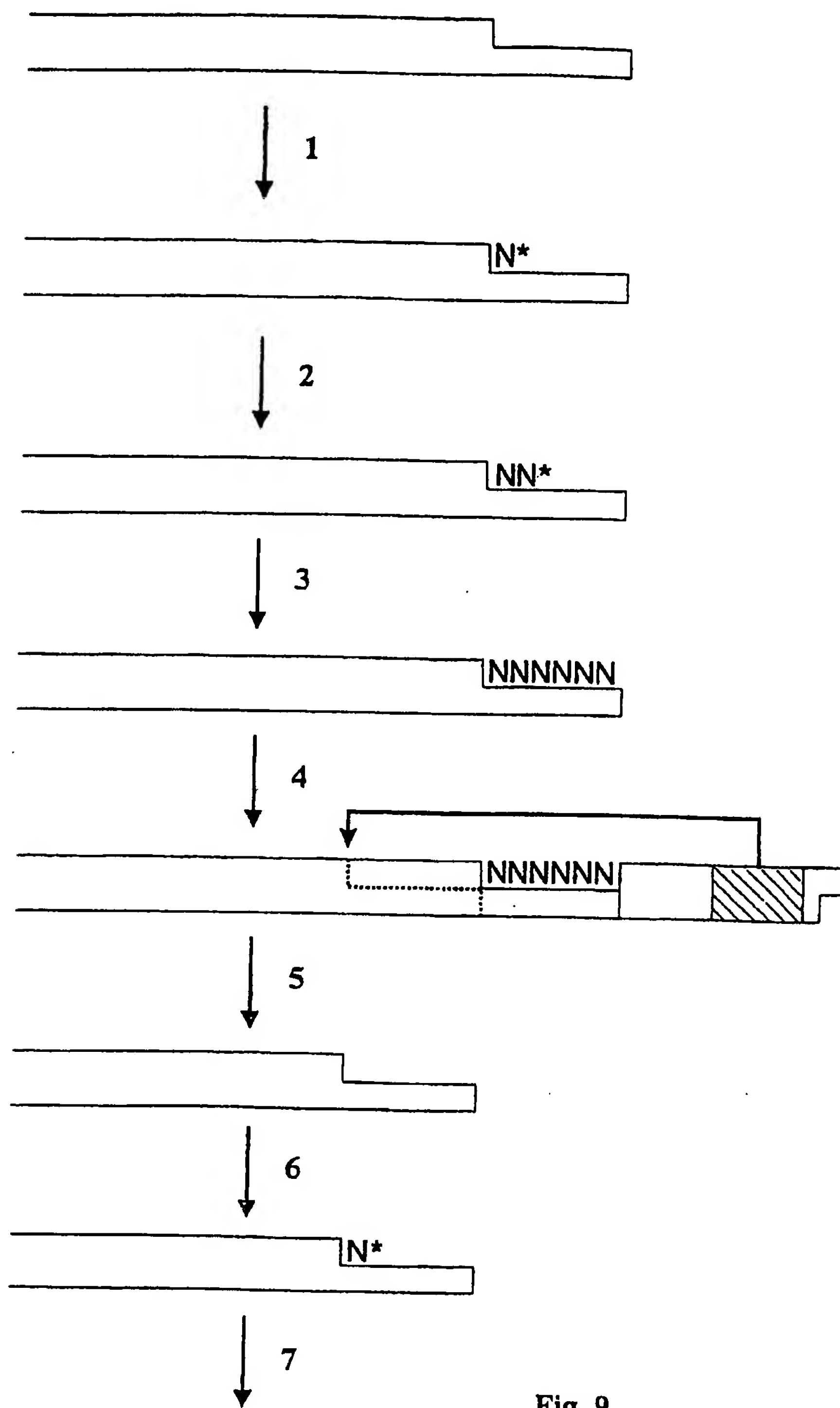


Fig. 9

12/15

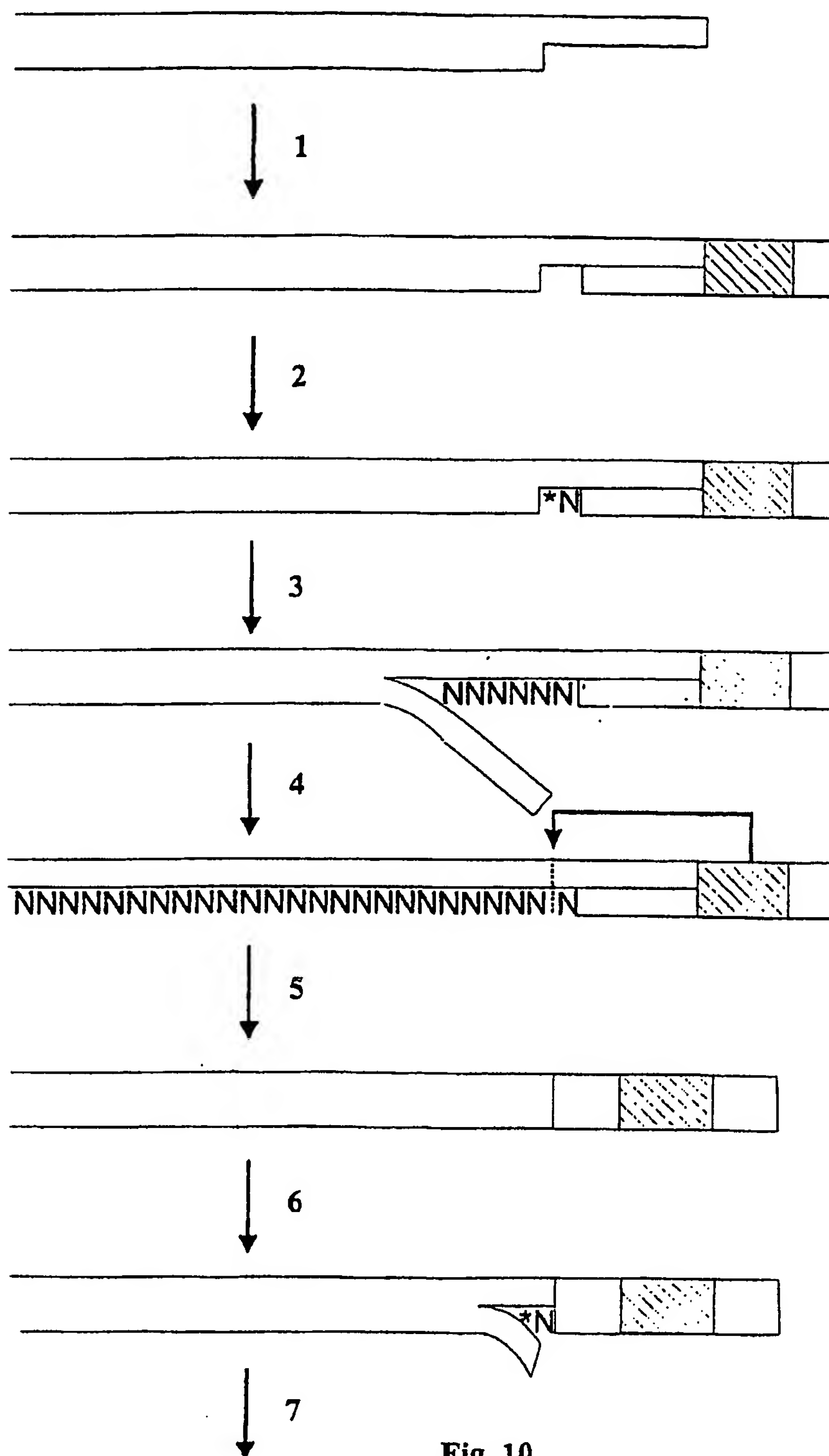


Fig. 10

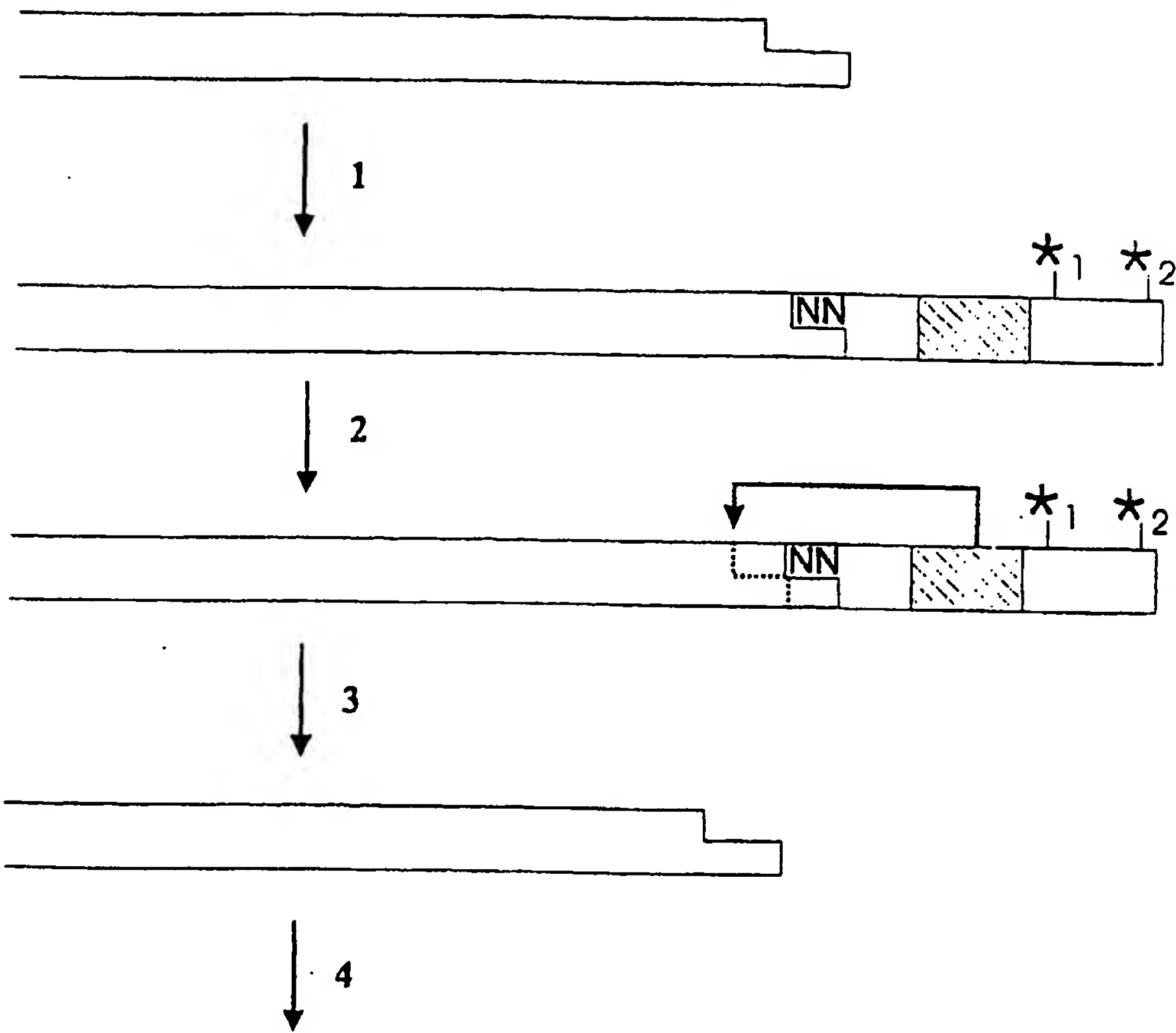


Fig. 12

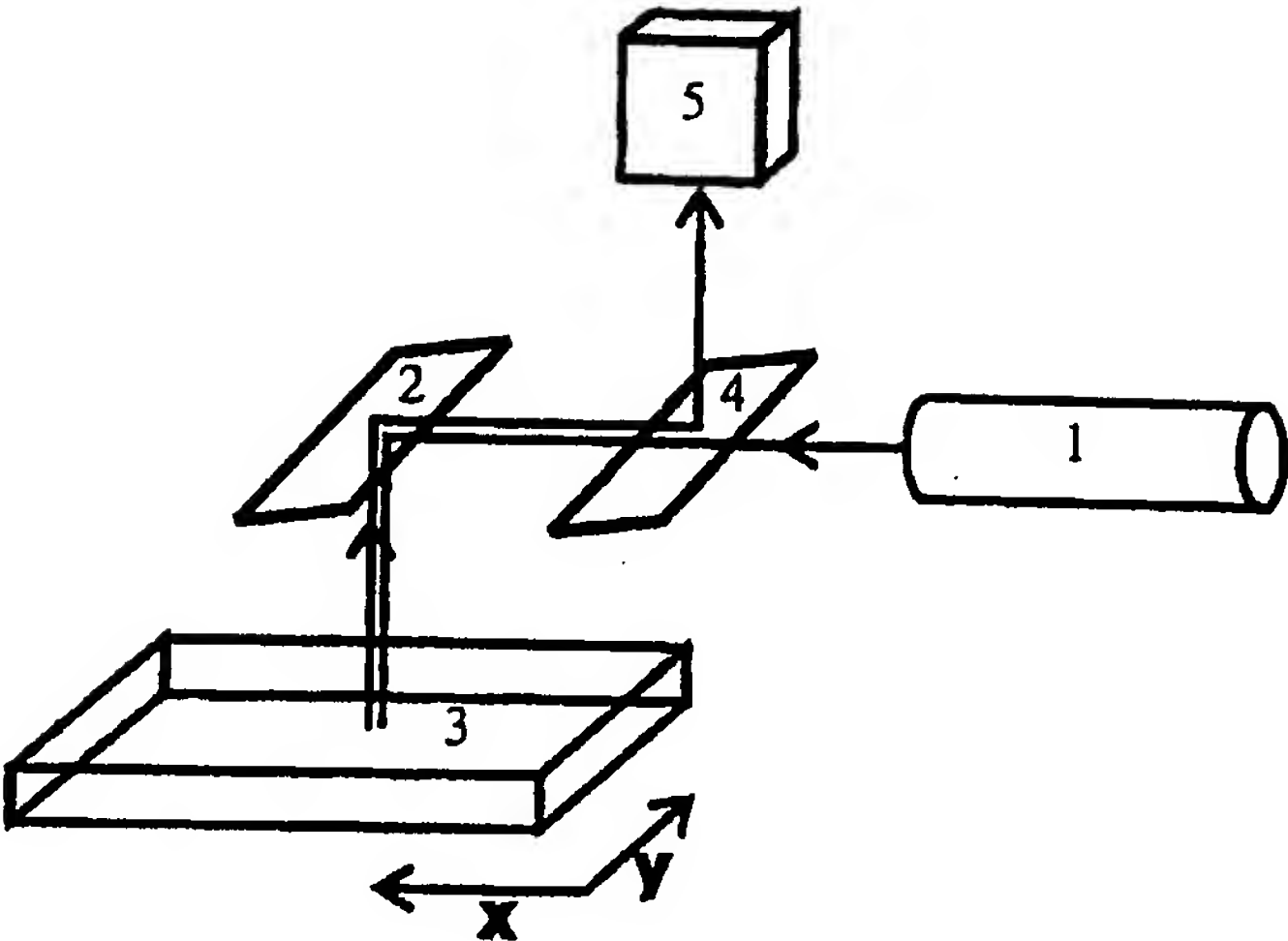


Fig. 13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.